
平成 11 年度

厚生省科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

発生工学を利用した老化・老化病モデルマウスの開発と
これに基づいた新規薬物設計に関する研究

研 究 報 告 書

平成 12 年 3 月

主任研究者 本 山 昇

平成 11 年度

厚生省科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

研 究 報 告 書

発生工学を利用した老化・老化病モデルマウスの開発と

これに基づいた新規薬物設計に関する研究

平成 12 年 3 月

主任研究者 本 山 昇

総括研究報告書

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

発生工学を利用した老化・老化病モデルマウスの開発と
これに基づいた新規薬物設計に関する研究

主任研究者 本 山 昇

長寿医療研究センター老年病研究部東洋医学・薬物療法開発室長

研究要旨

線虫において老化関連遺伝子やストレス抵抗性に関与する遺伝子の発現を制御していると考えられるフォークヘッド型転写因子 Daf-16 のマウスおよびヒトホモログ AFX と FKHL1 の cDNA を単離した。Akt によりリン酸化される Ser および Thr の変異体 (TM) を作成し、野生型が細胞質に局在するのに対して、TM は核に局在することを明らかにした。すなわち Daf-2 (インスリン様受容体)、Age-1 (PI-3K) と Akt からなるシグナルによって AFX および FKHL1 はその局在が細胞質にあることによって負に制御されていることを明らかにした。マウス AFX および FKHL1 のゲノム DNA を単離し、ターゲッティングコンストラクトを作成した。このコンストラクトは、loxP のシステムを用いており、定法での相同組換えにより loss-of-function マウスが樹立でき、さらに、Cre トランスジェニックマウスと交配することにより gain-of-function マウスを樹立できるように設計されている。現在、ES 細胞へのトランスフェクションを行っている。

早老症の一つである Ataxia Telangiectasia(AT)の原因遺伝子 ATM の下流ターゲット分子と考えられる Chk1 キナーゼのノックアウトマウスの作成に成功した。Chk1 ノックアウトマウスは、胎生期 3.5~7.5 日の間に致死であることを明らかにした。Chk1 ノックアウトマウスの初期胚を詳細に検討した結果、DNA 複製チェックポイントおよび DNA ダメージ

チェックポイントに重要な機能を果たし、M期への進行を制御していることを明らかにした。現在、Chk1ヘテロマウスに放射線照射し、寿命や老化現象を追跡調査中である。また、Chk1同様にATMの下流ターゲット分子として考えられるChk2(Cds1)のノックアウトマウスの作成を行った。ES細胞レベルでもChk2^{-/-}細胞の樹立に成功し、Chk2^{-/-}細胞でもG2/Mチェックポイントはほぼ正常であることを明らかにした。興味深いことに、Chk2^{-/-}細胞では、DNA障害によって誘導されるp53の安定化が起こらないことを明らかにした。現在、Chk2ノックアウトマウスおよびChk2とp53との関係を詳細に解析している。

<p>本山 昇</p>	<p>長寿医療研究センター 老年病研究部 東洋医学・ 薬物療法開発室 室長</p>	<p>A. 研究目的 老化の過程では、紫外線・電離放射線等の外界からのDNA障害性ストレス及び代謝の結果内因的に生じる活性酸素等の酸化ストレスに対する抵抗性・監視機構の減弱が重要な役割を果たしていると考えら</p>
<p>中山 啓子</p>	<p>九州大学 生体防御医学研究所 附属発生工学実験施設 助教授</p>	<p>れている。このような監視機構の破綻は、早期老化症やがんをはじめとする多くの老年病の原因となる。線虫やショウジョウバエにおいて長寿命を示す変異体の多くが生体ストレスに対して抵抗性を示すこ</p>
<p>澤 洋文</p>	<p>北海道大学 医学部 分子細胞病理 助教授</p>	<p>とが示されている。これらの変異体においては、インスリン様レセプターのシグナル伝達経路に関わる遺伝子群が同定されているが、哺乳類でのこの経路と老化との関係やストレス抵抗性の獲得メカニズムに</p>

については明らかにされていない。また、ヒトの早老症患者において DNA 障害性ストレスに対して、ゲノム DNA の安定性を監視維持するメカニズムに関与する分子の変異が同定されているが、早老症発症のメカニズムについては解明されていない。老化とストレスとの相関、老化及び老年病に対する創薬や治療法の開発には、哺乳類のモデル動物の作成が必須である。

生体ストレスに関わる分子として、線虫において寿命及びストレス抵抗性に関与する Daf-2、Age-1、Daf-16 等及び早老症を呈する Ataxia telangiectasia の原因遺伝子 ATM や NF- κ B、SAPK が考えられる。そこで本研究では、線虫において老化関連遺伝子やストレス抵抗性に関与する遺伝子の発現を制御していると考えられるフォークヘッド型転写因子 Daf-16 の哺乳類ホモログ及び ATM のターゲット分子である Chk1、Cds1 (Chk2) に着目して、老化と生体ストレスの関連を明らかにする目的で、Gene Targeting によるノックアウトマウス、さらに組織特異的・誘導型ノックアウトマウスの作成を中心に老化モデル

動物を作成し、個体レベルでの研究を進め生体ストレスに対する抵抗性の獲得メカニズムを明らかにするとともに老年病に対する薬物開発を企図することを目的として研究を進めた。

B. 研究方法

1. Daf-16 のマウスおよびヒトホモログの単離と解析

マウスおよびヒトの Daf-16 ホモログ AFX および FKHL1 のクローニングは、EST (expressed sequence tag) と PCR を駆使して行った。また、Akt によりリン酸化されると予想される Ser および Thr の変異体 (TM) は、PCR を用いて作成した。N 末端に FLAGtag を付加して発現ベクターに組み換えた。Fugene6 を用いて、Cos、HeLa および 293T 細胞に一過的に導入し、細胞内局在を抗 FLAG 抗体で染色し共焦点蛍光顕微鏡で解析した。また、誘導型発現ベクターとして、loxP/neo/loxP の下流に TM を導入したものを作成した。この発現ベクターでは、neo が発現するために下流の TM は発現しないようになっている。Cre を共発現させる

ことで loxP 間で組み換えがおこり neo が削除され TM が発現するようになる。同様に Fugene6 を用いて、Cos、HeLa および 293T 細胞に一過的に導入し、細胞内局在を抗 FLAG 抗体で染色し共焦点蛍光顕微鏡で解析するとともに、SDS-PAGE を行い抗 FLAG 抗体でウェスタンブロットを行った。

マウス AFX および FKHL1 のゲノム DNA は、129SV 由来の LambdaFIXII ライブラリーより定法によりクローニングを行いマッピングした。それをもとに、転写開始点の直下から第一コーディングエクソンを loxP/neo/loxP-FALG-AFX(FKHL1) で置換するようなターゲティングベクターを作成した。現在、ES 細胞へトランスフェクションし相同組み換えクローンのスクリーニングを行っている。

2. 早老症 AT の下流分子 Chk1 および Chk2 ノックアウトマウスの作成と解析

(1) Chk1 ノックアウトマウス

翻訳開始部位の ATG からキナーゼドメインの ATP 結合部位を neo で置換するようなターゲティングベクターを作成し、ES 細胞

に導入し、定法に従ってノックアウトマウスを作成した。また、高濃度 G418 選択および hyg からなるターゲティングベクターを用いて ES 細胞での両遺伝子座のノックアウト細胞の樹立を試みた。

Chk1^{-/-}マウスを得るために Chk1^{+/-}マウス同士を交配した。Plug 陽性の正午を胎生期 (E) 0.5 日とした。E2.5 から E3.5 の初期胚は卵管および子宮還流により採取した。E3.5 日の blastocyst を X 線、UV 照射および DNA 合成阻害剤 aphidicolin で処理したので、4%パラホルムアルデヒドで固定した。抗 phospho-Ser10/HistonH3 抗体および TUNEL 染色した後、DAPI にて核を染色し、蛍光顕微鏡にて解析した。その後、DNA を抽出し PCR 法によって genotype を同定した。

(2) Chk2 ノックアウトマウス

マウス Chk2 のゲノム DNA は、129SV 由来の LambdaFIXII ライブラリーより定法によりクローニングを行いマッピングした。翻訳開始部位 ATG を含む約 2.0kbp を neo で置換するようなターゲティングベクターを作成し、ES 細胞へ導入し定法に従ってノック

クアウトマウスを作成した。また、高濃度 G418 選択により Chk2^{-/-} ES 細胞を樹立した。さらに、Chk2^{+/-} マウス同士を交配し、E13.5 日の胎児より MEF (マウス胚性繊維芽細胞) を樹立し、これから定法により 3T3 化を行っている。

Chk2^{-/-} ES 細胞に 10Gy の X 線照射を行い、継続的に BrdU を取り込ませた後、70% エタノール固定を行った。こう FITC 標識抗 BrdU 抗体および PI にて染色した後、FACS にて細胞周期の解析を行った。また、X 線照射後、cell lysate を抽出し SDS-PAGE にて分離後、PVDF 膜に転写後、抗 p53 抗体にてウェスタンブロットを行った。検出は ECL を用いた。

3. ストレス応答分子 NF- κ B 活性化キナーゼの新規キナーゼ NAK の同定と解析

NAK、キナーゼ不活性型 NAK、IKK β およびキナーゼ不活性型 Ikk β を 293T 細胞に一過的に挿入し、細胞抽出液を調整し、IP-Kinase assay やウェスタンブロットによりリン酸化活性、I κ B の分解を解析した。また、NF κ B の転写活性および DNA 結合

活性は、ルシフェラーゼと EMSA (electrophoretic mobility shift assay) を用いて測定した。

C. 研究結果と考察

1. Daf-16 のマウスおよびヒトホモログの単離と解析

線虫 *C. elegance* の変異体 Daf-2 や Age-1 は長寿命の表現系を示すが、daf-16 変異によってその長寿命の表現系は消失してしまう。すなわち、転写因子である Daf-16 が長寿命に関わる遺伝子の発現を制御しているものと思われる。哺乳類においても Daf-2、Age-1、Akt、Daf-16 のシグナル経路は類似しているものが存在しており、インスリン様受容体、PI-3K、Akt、フォークヘッド転写因子 (AFX、FKHRL1、FKHR) がそれに相当する。そこで、哺乳類においても Daf-16 ホモログが老化に関わる遺伝子の発現を制御している可能性があると考え、これを検証するためにマウスおよびヒトの Daf-16 ホモログ AFX および FKHRL1 の cDNA クローンを EST (expressed sequence tag) から PCR を用いてクローニングし、

loss-of-function (ノックアウトマウス) および gain-of-function (活性化 AFX および FKHL1 ノックインマウス) の作成を試みた。

Daf-16 および AFX や FKHL1 は Akt によってリン酸化を受ける Ser と Thr 残基を持っており、リン酸化されると核から細胞質へ局在を移動させることが知られている。14-3-3 結合部位が形成される。そこで、AFX や FKHL1 の活性制御機構を解析する目的で細胞内局在を検討した。野生型 AFX や FKHL1 は主に細胞質に局在したが、一方 Akt によるリン酸化部位の変異体である AFX-TM や FKHL1-TM は、核に強く局在することが明らかになった。以上の結果は、通常のインスリン様受容体からのシグナルにより PI-3K が活性化され、続いて活性化された Akt により AFX や FKHL1 はリン酸化されることによって細胞質に留まり不活性化されていることが明らかになった。Daf-2 などの変異体では、このシグナル経路が不活性化されているために Daf-16 が核内に移行し、老化に関わる遺伝子の発現を制御していることが示唆される。次に

loss-of-function (ノックアウトマウス) および gain-of-function (活性化 AFX および FKHL1 ノックインマウス) の作成するために、Cre-loxP/neo/loxP を用いたシステムを用いた。まず、loxP/neo/loxP の下流に FLAGtag を付加した AFX-TM および FKHL1-TM (loxP/neo/loxP-AFX-TM および loxP/neo/loxP-FKHL1-TM) を作成した。このシステムでは、neo 遺伝子が発現するので、下流の AFX-TM や FKHL1-TM は発現しない。Cre によって loxP 間で組み換えが起こり neo が欠失したときのみ下流の AFX-TM や FKHL1-TM が発現できるようになる。これを検証するために loxP/neo/loxP-AFX-TM および loxP/neo/loxP-FKHL1-TM の発現ベクター単独もしくは Cre 発現ベクターと同時にトランスフェクションを行い、抗 FLAG 抗体により細胞染色およびウエスタンブロットにより発現を検討した。loxP/neo/loxP-AFX-TM および loxP/neo/loxP-FKHL1-TM の単独では発現は認められなかったが、Cre を同時に発現させた場合のみ、AFX-TM および FKHL1-TM の発現誘導が認められた。そこで、FKHL1

の転写開始部位の直下から第一コーディングエクソンを loxP/neo/loxP-FKHRL1-TM で置換するようなターゲティングベクターを構築した。現在 ES 細胞に導入し、相同組み換えを起こしたクローンのスクリーニングを行っている。今後、定法に従って変異マウスを作成する予定である。このマウスでは、neo が存在する場合は loss-of-function (ノックアウトマウス) になり、また Cre トランスジェニックマウスと交配することにより、gain-of-function (活性型 FKHRL1 ノックインマウス) が樹立できる。また、組織特異的に発現する Cre トランスジェニックマウスと交配することによって組織特異的活性型 FKHRL1 ノックインマウスが樹立できる。これらのマウスを用いて老化・寿命を追跡調査していく予定である。

2. 早老症 AT の下流分子 Chk1 および Chk2 ノックアウトマウスの作成と解析

早老症を呈する Ataxia Telangiectasia (AT) の原因遺伝子である ATM の変異から老化症状に至るカスケードは全く明らかに

されていない。AT 患者の特徴として放射線感受性が挙げられ、細胞レベルでも放射線感受性および細胞周期チェックポイント異常が認められる。そこで、ATM のシグナルカスケードの中でも細胞周期のチェックポイントに関与する下流ターゲット分子である Chk1 キナーゼおよび Chk2 キナーゼに着目し、ノックアウトマウスを作成し、老化との関係を明らかにすることを試みた。

(1) Chk1 ノックアウトマウス

定法によってノックアウトマウスを作成した。Chk1^{-/-}マウスを得るために Chk1^{+/-}マウス同士を交配し出生マウスの遺伝子解析を行った結果、Chk1^{-/-}マウスは誕生せず embryonic lethal であることが明らかになった。さらに胎生期をさかのぼって解析したところ、胎生期 (E) 7.5 日でも Chk1^{-/-}胎児は存在しなかったが、E3.5 日の blastocyst ステージではメンデルの法則から予想される 1 : 2 : 1 の割合で Chk1^{+/+}、Chk1^{+/-}、Chk1^{-/-}が認められたことから、Chk1^{-/-}マウスは E3.5 日から E7.5 日の間に死亡することが明らかになった。

Embryonic lethal の原因を解析するため

に E2.5 日から E4.0 日の初期胚を詳細に解析した。形態的には異常は認められなかったが、DAPI により核を染色したところ、Chk1^{-/-}では核の凝縮と断片化が認められた。特に増殖の激しい inner cell mass の細胞に顕著に認められた。このような異常が後の発生にどのような影響があるのかを解析するために、E3.5 日の blastocyst を in vitro で 4 日間培養し観察したところ、Chk1^{-/-}胚は正常に hatch しプラスティックディッシュに付着した。ほとんど増殖しない trophoblast giant cell はほぼ正常に認められたが、将来胎児になる増殖が盛んな inner cell mass (ICM) は全く発育しなかった。以上の結果から、Chk1 は初期の胚発生に必須の役割を果たしていることを強く示唆している。

主に増殖性の細胞に核の異常が認められることから、DNA 複製と細胞周期に異常があることが予想されたので、DNA 合成の阻害剤で DNA の複製を阻害したときの DNA 複製チェックポイントを解析した。DNA polymerase α で DNA 合成を阻害すると Chk1^{-/-}における核の断片化がさらに増強

したことから、DNA 複製チェックポイントに異常がある可能性が考えられた。そこで、Aphidicolin で DNA 合成を阻害した後、nocodazol を加え M 期の進行をブロックした状態で M 期のマーカーである HistonH3 の Ser10 のリン酸化を抗リン酸化抗体で染色することにより解析した。Chk1^{+/+}および Chk1^{+/-}では、DNA 複製チェックポイントが正常に働き細胞周期が G2 期で停止し M 期に移行しないため、リン酸化 histonH3 陽性細胞は全く検出されなかった。一方、Chk1^{-/-}ではかなりの割合でリン酸化 HistonH3 陽性細胞が認められ M 期に移行していることが明らかになった。これらのことから、Chk1^{-/-}マウスでは DNA 複製が完全に終了する前に G2 期で細胞周期が停止することなく M 期へと進行し核の断片化を起こすため細胞が増殖することができず embryonic lethal になると考えられた。

AT 患者および AT 患者由来の細胞の放射線感受性と Chk1 との関係を検討するために、Chk1^{-/-}を用いて電離放射線や紫外線照射に対する反応を解析した。Chk1^{+/+}や Chk1^{+/-}では、X 線照射および UV 照射によ

り DNA 障害を起こすと G2 チェックポイントが働き細胞周期を停止したが、Chk1^{-/-}では、G2 チェックポイントが正常に作動せず、M 期に進行してしまい、リン酸化 Histone H3 陽性細胞が検出された。従って、Chk1 は、DNA 複製の停止や DNA 傷害に対して、DNA 修復によりゲノムの integrity を維持するために細胞周期を G2 で停止させるチェックポイント制御に極めて重要な役割を果たしていることが明らかになった (Takai H, K Tominga, N Motoyama, H Nagahama, T Tsukiyama, K Ikeda, M Nakanishi, K Nakayama, K. Nakayama. Aberrant Cell Cycle Checkpoint Function and Early Embryonic Death in Chk1^{-/-} Mice., 投稿中)。最近 ATM のホモログである ATR ノックアウトマウスが作成され、Chk1^{-/-}マウスとほぼ同様な表現系を示し胚発生初期で致死となることが報告されている (Brown EJ and D Baltimore. Genes Dev. 14: 397, 2000)。これらのことからある種の DNA 傷害に対しては Chk1 は ATR の下流で働いていると考えられる。

Chk1^{-/-}マウスが胎生致死となつてこと

から、老化における Chk1 キナーゼの役割は Chk1^{-/-}マウスを用いて解析できなくなつたが、Chk1 は染色体上で ATM の近傍に位置することから haploinsufficiency などと考えられるので、現在 Chk1^{+/-}マウスに 4 Gy の X 線照射を行い、その後の寿命や発ガンに対する影響を追跡調査中である。また、Cre/loxP のシステムを用いた組織特異的ノックアウトマウスも作成中であり、胎生致死を克服しある特定の組織における Chk1 の老化に対する役割を解析する予定である。

(2) Chk2 ノックアウトマウス

ATM の下流ターゲット分子である Chk2 キナーゼの AT の種々の症状、とりわけ老化における関与を解析する目的で Chk2 ノックアウトマウスの作成を進めた。翻訳開始部位から約 2 kbp を neo で置換するようなターゲットベクターを用いて定法によりノックアウトマウスを作成した。Chk2^{+/-}マウスは、外見上全く異常が認められていない。Chk2^{-/-}マウスを得るために Chk2^{+/-}マウス同士を交配させて最近生まれたところで、遺伝子座解析を進めようとしているところ

である。また、高 G418 選択で Chk2^{-/-}ES 細胞の樹立に成功した。この細胞を用いて、DNA 傷害における細胞周期チェックポイントを解析した。ES 細胞では pRb が発現していないなどの理由で G1 arrest は起こらないが、G2 arrest が起こり細胞周期が停止する。Chk2^{-/-}ES 細胞においても X 線照射に応答して G2 arrest が起こることが明らかになった。この G2 arrest は、ATM や ATR の阻害剤であるカフェインで処理することにより消失した。これらのことから、DNA 傷害における G2 チェックポイントには、Chk2 はあまり関与しておらず、ATM や ATR の下流に存在する他の分子、おそらく Chk1 が関わっていることを示唆している。

一般の細胞では、DNA 傷害を与えたときに G2 チェックポイントのみならず、G1 チェックポイントも働くが、このチェックポイントにはガン抑制遺伝子産物 p53 が関与していることが知られている。DNA 傷害が入ると p53 分子の種々の部位がリン酸化されて分子の安定化が起こるとともに活性化されることが知られている。そこで、Chk2^{-/-}細胞において DNA 傷害に

p53 が安定化されるかどうかを検討した。Chk2^{+/+}および Chk2^{+/-}ES 細胞では、X 線照射により p53 分子の安定化が認められた。しかし、Chk2^{-/-}ES 細胞では、p53 分子の安定化は起こらなかった。最近、Chk1 および Chk2 が DNA 傷害を受けたときに p53 をリン酸化するという報告がある (Shieh SY, et al., *Genes Dev.* 14: 289, 1999)。また、Chk2 が p53 分子の安定化を介して G1 チェックポイントに働いていることを示唆する報告がある (Chehab NH, et al., *Gene Dev.* 14: 278, 1999)。これらのことを考えると Chk2 は DNA 傷害時に p53 をリン酸化することによって安定化し、p53 の活性化に寄与していることが考えられる。興味深いことに、p53 の変異が原因である Li-Fraumeni Syndrome の p53 に変異が見つからない患者において、Chk2 の変異が同定されている (Bell DW, et al., *Science* 286: 2528, 1999)。これらのことから Chk2 と p53 との機能的な interaction が考えられるため現在 Chk2 ノックアウトマウスと p53 ノックアウトマウスの交配を開始している。また、p53 は細胞周期のチェックポイントのみ

らず、p53R2 を介して DNA 修復にも関与していることが明らかになり (Tanaka H, et al., Nature 404: 42, 2000)、Chk2 は p53 の上流で働くと考えられるので、Chk2^{-/-} マウスでは DNA 修復がうまく働かずゲノムの instability が生じている可能性が考えられるので、Chk2 ノックアウトマウスの寿命やガン化を追跡調査して AT に見られる老化症状などの症状が見られるか検討していく予定である。

3. ストレス応答分子 NF- κ B 活性化キナーゼの新規キナーゼ NAK の同定と解析

種々の生体ストレスに応答して活性化される NF- κ B の活性化において重要な I κ B キナーゼ (IKK) に類似した新規キナーゼ NAK (NF- κ B-activating kinase) をクローニングしその機能解析を行った。NAK は *in vivo* において I κ B の分解に必須である Ser32 と Ser36 のリン酸化を誘導するが、これは dominant negative IKK β によって抑制された。また、*in vitro*では I κ B の Ser36 のみをリン酸化した。さらに NAK は IKK β の活性化に必要な activation loop のセリン

残基をリン酸化することが明らかになった。これらのことから、NAK は IKK として働いているのではなく、IKK をリン酸化し活性化することによって NF- κ B の活性化を誘導していることが考えられた (Tojima Y, et al., Nature, 2000, in press)。

D. 結論

1. 線虫の長寿命に関わる遺伝子の発現を制御していると考えられる Daf-16 のマウスおよびヒトホモログをクローニングし、その活性は Akt によるリン酸化によって細胞内局在を変化させることで制御されていることを明らかにした。

2. 早老症の一つである Ataxia Telangiectasia (AT) の原因遺伝子 ATM の下流ターゲット分子である Chk1 および Chk2 ノックアウトマウスの作成を行った。Chk1 は DNA 複製チェックポイント、DNA ダメージチェックポイントにおいて G2 arrest を起こすのに重要な機能をはたしていることを明らかにした。一方、Chk2 はガン抑制遺伝子 p53 の安定化に重要な機能を果たしており、チェックポイントのみなら

ず DNA 修復にも関与することを示唆する結果を得た。

3. 種々の生体ストレスに応答して活性化される NF- κ B の活性化する新しいキナーゼ NAK を同定し、新たな NF- κ B 活性化経路を明らかにした。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Tojima Y, A Fujimoto, M Delhase, Y Chen, S Hatakeyama, K Nakayama, Y Kaneko, Y Nimura, N Motoyama, K Ikeda, M Karin, M Nakanishi: NAK, a novel I κ B kinase-activating kinase. *Nature*, 2000, in press.
2. Takai H, K Tominaga, N Motoyama, H Nagahama, K Ikeda, M Nakanishi, K Nakayama, K Nakayama: Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1^{-/-} mice. Submitted.
3. Watanabe Y, T Watanabe, M Kitagawa, Y Taya, K Nakayama, N Motoyama: pRb phosphorylation is regulated differentially by cyclin-dependent kinase (Cdk) 2 and Cdk4 in retinoic acid-induced neuronal differentiation of P19 cells. *Brain Res.* 182: 342, 1999.
4. Urase K, T Momoi, E Fujita, K Isahara, Y Uchiyama, A Tokunaga, K Nakayama, N Motoyama: Bcl-xL is a negative regulator of caspase-3 activation in immature neurons during development. *Dev. Brain Res.* 116: 69, 1999.
5. Doi T, N Motoyama, A Tokunaga, T Watanabe: Death signals from B cell antigen receptor target mitochondria, activating necrotic and apoptotic death cascades in a murine B-cell line, WEHI-231. *Int. Immunol.* 11: 933, 1999.

6. Motoyama N, T Kimura, T Takahashi, T Watanabe, T Nakano: Bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *J. Exp. Med.* 189: 1691, 1999.
7. Ohi N, A Tokunaga, H Tsunoda, K Nakano, K Haraguchi, K Oda, N Motoyama, T Nakajima: A novel adenovirus E1B19K-binding protein B5 inhibits apoptosis induced by Nip3 by forming a heterodimer through the C-terminal hydrophobic region. *Cell Death & Differentiation* 6: 314, 1999.
8. Shirane M, S Hatakeyama, K Hattori, K Nakayama, K Nakayama: Common pathway for the ubiquitination of I κ B α , I κ B β , and I κ B ϵ mediated by the F-box protein FWD1. *J. Biol. Chem.* 274: 28169, 1999.
9. Kitagawa M, S Hatakeyama, M Shirane, M Matsumoto, N Ishida, K Hattori, I Nakamichi, A Kikuchi, K Nakayama, K Nakayama: An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of β -catenin. *EMBO J.* 18: 2401, 1999.
10. Hatakeyama S, M Kitagawa, K Nakayama, M Shirane, M Matsumoto, K Hattori, H Higashi, H Nakano, K Okumura, K Onoe, RA Good, K Nakayama: Ubiquitin-dependent degradation of I κ B α is mediated by a ubiquitin ligase Skp1/Cul1/F-box protein FWD1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 3859, 1999.
11. Ohba Y, H Suzuki, H Hiraga, T Ito, H Sawa, M Nagai, S Satoh, H Iwaki, K Nagashima: Melanotic peritoneal sarcomatosis originating from clear cell

- sarcoma. *Pathol. Int.* 49: 653, 1999.
12. Suzuki G, H Sawa, Y Kobayashi, Y Nakata, K Nakagawa, A Uzawa, H Sakiyama, S Kakinuma, K Iwabuchi, K Nagashima: Pertussis toxin-sensitive signal controls the trafficking of thymocytes across corticomedullary junction in the thymus. *J. Immunol.* 162: 5891, 1999.
2. 学会発表
1. 高井裕之、富永 薫、本山 昇、池田恭治、中西 真、長浜裕康、中山 啓子、中山敬一 Chk1 キナーゼ欠損マウスを用いた Chk1 キナーゼの機能解析 第22回日本分子生物学会年会 平成11年12月7日～10日 福岡
2. 藤本淳司、東島由一郎、Chen Y、畠山鎮次、中山敬一、金子葉子、本山 昇、池田恭治、Karin M、中西 真 新規 NF- κ B 活性化キナーゼ (NAK) 遺伝子の機能解析 第22回日本分子生物学会年会 平成11年12月7日～10日 福岡
3. Takai H, K Tominaga, N Motoyama, K Ikeda, M Nakanishi, H Nagahama, K Nakayama, K Nakayama. Early embryonic lethality of Chk1 kinase-deficient mice: essential role in DNA replication checkpoint. Keystone Symposia, Cancer, Cell Cycle and Therapeutics, January 8-13, 2000, Colorado, USA
4. Motoyama N, H Takai, K Tominaga, K Nakayama, K Nakayama, K Ikeda, M Nakanishi. Chk1 and Cds1 (Chk2) checkpoint genes in the cellular response to DNA damage. Gordon Research Conferences, Biology of Aging, January 31-February 4, 2000, Ventura, CA,

USA

5. Fujimoto A, Y Tojima, M Delhase, Y Chen, S Hatakeyama, K Nakayama, Y Kaneko, N Motoyama, K Ikeda, M Karin, M Nakanishi. NAK, a novel I κ B kinase-activating kinase. Keystone Symposia, February 22-27, 2000, Lake Tahoe, CA, USA

6. 北川雅敏、畠山鎮次、白根道子、中山啓子、中山敬一 細胞の悪性化に
関与する特異的蛋白質の分解の分子機構 第22回日本分子生物学会年会 平成11年12月7日～10日 福岡

7. 畠山鎮次、北川雅敏、松本雅紀、白根道子、服部公彦、中野裕康、奥村康、菊池 章、中山啓子、中山敬一 I κ B α と β -catenin の分解に関与するユビキチン化酵素複合体 SCFWD1 第22回日本分子生物学会年会 平成11年12月7日～10日 福岡

8. 白根道子、畠山鎮次、服部公彦、中山啓子、中山敬一 I κ B α 、I κ B β 、I κ B ϵ の F-box 蛋白質 FWD1 によるユビキチン化 第22回日本分子生物学会年会 平成11年12月7日～10日 福岡

9. 築山忠雄、畠山鎮次、北川雅敏、中山啓子、中山敬一 T細胞の分化と細胞周期：p27Kip1 トランスジェニックマウスの解析 第22回日本分子生物学会年会 平成11年12月7日～10日 福岡

F. 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

NAK is an I kappa B kinase-activating kinase

Yuichiro Tojima^{*,†}, Atsushi Fujimoto^{*}, Mireille Delhase[‡], Yi Chen[‡],
Shigetsugu Hatakeyama[§], Kei-ichi Nakayama[§], Yoko Kaneko^{*}, Yuji Nimura[†],
Noboru Motoyama^{*}, Kyoji Ikeda^{*}, Michael Karin[‡], and Makoto Nakanishi^{*,||}

^{*}Department of Geriatric Research, National Institute for Longevity Sciences,
Obu, Aichi 474-8522, Japan

[†]Department of Surgery, Nagoya University Medical School, Shouwa-ku,
Nagoya, Aichi 466-8550, Japan

[‡]Laboratory of Gene Regulation and Signal Transduction, Department of
Pharmacology, University of California San Diego, School of Medicine, La Jolla,
California 92093-0636, USA

[§]Department of Molecular and Cellular Biology, Medical Institute of
Bioregulation, Kyusyu University, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

^{||}Department of Biochemistry, Nagoya City University Medical School,
Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8601, Japan

Corresponding author: Makoto Nakanishi, M.D., Ph.D., at Department of
Biochemistry, Nagoya City University Medical School, 1 Kawasumi, Mizuho-

cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8601 Japan

Phone: 81-52-853-8145; Fax: 81-52-842-3955;

E-mail: mkt-naka@med.nagoya-cu.ac.jp