

それぞれの現象に関わる代表的な遺伝子を選んで、その遺伝子発現の転写調節機構を解析して得られるデータと、抗酸化剤など、いわゆる老化制御として試みられる方法の作用機序を検討した結果の両方をつきあわせることにより、血管の老化とその防御についての理解が深まることが期待される。また、特に血管平滑筋細胞の増殖と遊送の抑制については、生体における老化制御ともいえる動脈硬化制御の観点から、きわめて重要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hashimoto M, Eto M, Akishita M, Kozaki K, Ako J, Iijima K, Kim S, Toba K, Yoshizumi M, Ouchi Y: Correlation between flow-mediated vasodilatation of the brachial artery and intima-media thickness in the carotid artery in Men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2795-2800, 1999.
2. Sibinga NE, Wang H, Perrella MA, Endege WO, Patterson C, Yoshizumi M, Haber E, Lee ME: Interferon-gamma-mediated inhibition of cyclin A gene transcription is independent of individual cis-acting elements in the cyclin A promoter. *J Biol Chem* 274:12139-12146, 1999.
3. Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Kim S, Eto M, Ako J, Liang YQ, Sudoh N, Hosoda K, Nakahara K, Toba K, Ouchi Y: Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation* 101:805-811, 2000.
4. Nagano K, Toba K, Akishita M, Watanabe T, Kozaki K, Eto M, Hashimoto M, Sudoh N, Ako

J, Yoshizumi M, Ouchi Y: Prostanoids regulate proliferation of vascular smooth muscle cells induced by arginine vasopressin. *Eur J Pharmacol* 389:25-33, 2000.

5. Suzuki E, Nagata D, Yoshizumi M, Kakoki M, Goto A, Omata M, Hirata Y: Reentry into the cell cycle of contact-inhibited vascular endothelial cells by a phosphatase inhibitor. Possible involvement of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 275:3637-3644, 2000.

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第二生化学 助教授

細胞老化の原因として様々な外的ストレスによる DNA 傷害の蓄積と、傷害 DNA の修復能の低下があげられる。DNA 傷害に反応した細胞周期停止機構と修復制御機構を明らかにする目的で、Chk1 および Cds1 の 2 つのプロテインキナーゼ遺伝子の同定を行い、これらの生理機能および老化、癌化との関連について解析した。

A. 研究目的

真核細胞は、紫外線あるいは放射線等により染色体 DNA に傷害をうけると、細胞周期を停止して効率的に傷害 DNA を修復する機構を持っている。一方、細胞は DNA 複製が完了するまで決して細胞分裂を起こさない。これらの機構は DNA 複製あるいは傷害チェックポイントと呼ばれ、染色体 DNA を安定に維持する分子機構の 1 つである。近年、DNA 傷害の蓄積と修復能の低下が細胞老化の原因の 1 つと考えられるようになってきたが、これらチェックポイントの分子機構については未だ不明な点が多い。我々は、チェックポイント機構が酵母からヒトに至るまでよく保存されていると予想して、PCR 法を用いてヒト Chk1 および Cds1 プロテインキナーゼを同定した。本研究ではこれらのキナーゼを中心に、高等動物における DNA 複製および傷害チェックポイント機構を解明し、これらの機構の異常と細胞老化との関連について解析する。

B. 研究方法

(1) ヒト Chk1 の DNA 傷害あるいは複製チェックポイント機構における役割を明らかにするために、正常線維芽細胞、HeLa 細胞、ATM 欠失線

維芽細胞を G1/S 移行期に同調させて、それぞれ UV、X 線、MMS、アフィディコリンで細胞を処理した後に、抗 Chk1 抗体を用いて Chk1 タンパク質の修飾および活性変化を測定した。Chk1 の活性測定には基質として GST-Cdc25C を用いた。同様に、ヒト Cds1 についても解析した。

(2) Chk1 の生理機能を明らかにする目的で、Chk1 ノックアウトマウスの作製とその解析を行った。

（倫理面への配慮）

ノックアウトマウス作製にあたり、大学の承認を受け、大学規定の動物実験指針に従った。

C. 研究結果

(1) ヒト Chk1 はいかなる DNA 傷害にも反応せず、その活性に変化を認めなかった。興味あることにヒト Chk1 はアフィディコリン処理による DNA 複製阻害に反応してリン酸化を受けることが分かった。Cds1 は Chk1 と異なり、正常線維芽細胞および HeLa 細胞においてはすべての DNA 傷害に反応してリン酸化を受けて活性化した。しかしながら、ATM 欠失細胞においては UV および MMS による DNA 傷害には反応するが、X 線によるものには全く反応しなかった。このこ

とは ATM 欠損患者の臨床症状とよく一致する。

(2) ヒト Cds1 の発現を各種ガン細胞を用いて調べたところ、p53 欠失ガン細胞では Cds1 の発現が高く、正常 p53 を有するものでは Cds1 の発現が非常に低いことが分かった。Cds1 の発現は Oncoprotein で形質転換すると強く誘導されることが分かった。さらに野生型 p53 発現アデノウイルスをこれらの細胞に感染させたところ、SV40 largeT 抗原および E6 により誘導された Cds1 の発現は強く抑制されたが、E7 により誘導されたものは影響を受けなかった。

(3) Chk1 ノックアウトマウスの作製とその解析を行ったところ、Chk1 ノックアウトマウスは胎生初期に致死性であった。E3.5 日卵の解析から Chk1 ノックアウト卵では異常核を認めた。この異常核は DNA 複製阻害において増強されたが、DNA 傷害では増強されなかった。

D. 考察

哺乳動物細胞において Chk1 は DNA 複製チェックポイントを、Cds1 は DNA 傷害チェックポイントをそれぞれ制御すると考えられた。この結果は分裂酵母における DNA 傷害・複製チェックポイント機構と多少異なる新しい制御機構が存在することを示唆している。しかしながら、これら Chk1 および Cds1 がいかなる分子機構により活性制御されているのか、また Chk1 および Cds1 の下流で働き細胞周期制御に直接関与する因子についても未だ未知の部分が多い。今後これらの点について明らかにすることは、哺乳動物細胞における染色体安定性維持機構の理解につながるのみならず、癌および老化の分子機構の全貌解明に近づくものと考えられる。

E. 結論

哺乳動物細胞において、Chk1 は DNA 複製チ

ェックポイントを、Cds1 は DNA 傷害チェックポイントを制御していると考えられた。今後、これらの因子の細胞老化への関与を明らかにする予定である。

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* 18, 3673-3681, 1999.
2. Nakanishi, K., Nakanishi, M., Kukita, F. Dual intracellular recording of neocortical neurons in a neuron-glia co-culture system. *Brain Res. Protocol.* 4, 105-114, 1999.
3. Nakanishi, M., Kaneko, K., Matsuhime, M., Ikeda, K. Direct interaction of p21 cyclin-dependent kinase inhibitor with the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 35-40, 1999.
4. Kaneko, Y., Ikeda, K., Nakanishi, M. Phorbol ester inhibits DNA damage-induced apoptosis in U937 cells through activation of protein kinase C. *Life Science* 65, 2251-2258, 1999.
5. Tominaga, K., Morisaki, H., Kaneko, Y., Fujimoto, A., Tanaka, T., Ohtsubo, M., Hirai, M., Okayama, H., Ikeda, K., Nakanishi, M. Role of human Cds1(Chk2) kinase in DNA damage checkpoint and its regulation by p53. *J. Biol. Chem.* 274, 31463-31467, 1999.
6. Kitamura, K., Takayama, M., Hamajima, N., Nakanishi, M., Endo, Y., Takemoto, T., Kimura, H., Iwaki, M., Nonaka, M. Characterization of

- the Human DRP-2 (dihydropyrimidinase-related protein 2) Gene. DNA Research 6, 291-297, 1999.
7. Mitsui, K., Nakanishi, M., Ohtsuka, S., Norwood, T.H., Obayashi, K., Miyamoto, M., Tanaka, K., Yoshimura, A., Ohtsubo, M. A novel human gene encoding HECT domain and RCC1-like repeats interacts with cyclins and is potentially regulated by the tumor suppressor proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 266, 115-122, 1999.
8. Morisaki, H., Ando, A., Nagata, Y., Pereira-Smith, O.M., Smith, J.R., Ikeda, K., Nakanishi, M. Complex mechanisms underlying impaired activation of Cdk4 and Cdk2 in replicative senescence: role of p16, p21 and cyclin D1. Exp. Cell Res. 253, 503-510, 1999.
9. Ogawa, K., Kimoto, N., Asamoto, M., Nakanishi, M., Takahashi, S., Shirai, T. Aberrant expression of p27Kip1 is associated with malignant transformation of the rat urinary bladder epithelium. Carcinogenesis 21, 117-121, 2000.
10. Takahashi, H., Menjo, M., Kaneko, Y., Ikeda, K., Matsushime, H., Nakanishi, M. Cdk4 activation is dependent on the subunit rearrangement in the complexes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 267, 388-393, 2000.
11. Fuse, T., Tanikawa, M., Nakanishi, M., Ikeda, K., Tada, T., Inagaki, H., Asai, K., Kato, T., Yamada, K. p27Kip1 expression by contact inhibition as a prognostic index of human glioma. J. Neurochem. in press.
12. Akita, H., Iizuka, A., Hashimoto, Y., Kohri, K., Ikeda, K., Nakanishi, M. Induction of KAI-1 Expression in Metastatic Cancer Cells by Phorbol Esters. Cancer letters in press.
13. Tojima, A., Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kaneko, Y., Nimura, Y., Motoyama, N., Ikeda, K., Karin, M., and Nakanishi, M. NAK is an I kappa B kinase-activating kinase. Nature in press.
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