

## A. 研究目的

我々のゲノム情報は、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さらされており、個体内においてあるいは世代を越えて、精巧な監視・修復機構によって守られている。ゲノムの integrity はいくつかのステップで保証されている。Ku、DNA-PK、Rad 51、Sir complex、BRCA などは DNA の修復過程に関わる。BLM や WRN は、recombination を抑えることによって genome stability を保っている。染色体末端の telomere は、細胞が分裂するたびに短小化し、分裂時計として機能するのみならず、染色体同士の融合を防ぐことによって genome stability に寄与している。さらに、p53 や ATM は、細胞周期のチェックポイント機構を介してゲノム安定化に関わっている。これらのうち、WRN、BLM、ATM は、それぞれ遺伝的な早発老化症（早老症）である Werner 症候群、Bloom 症候群、Ataxia Teleangiectasia (AT) の原因遺伝子であり、老化現象がゲノムの integrity あるいは stability と密接な関係にあることが示唆される。

我々は、早老症の一つである末梢血管拡張性運動失調症 ataxia teleangiectasia (AT) に着目して、ゲノムの安定性維持機構と老化・老年病の発症に関する研究を推進した。AT は、進行性の小脳失調症、毛髪・皮膚の早期老化、卵巣不全・インスリン抵抗性などの内分泌異常、免疫不全と易感染性、高発癌性など多彩な症状を呈し、通常 30

-40歳台で死亡する常染色体劣性遺伝病である。原因遺伝子 ATM (AT mutated) は1995年に同定され、PI3 kinase ファミリーに属する蛋白キナーゼで、細胞のストレス応答、細胞周期のチェックポイントを介してゲノムの維持機構、さらに電離放射線などで傷害された DNA の修復に関与することが示唆されている。

我々は、ATM の下流で働き DNA 傷害のシグナルを細胞周期制御因子へと伝達する主要なキナーゼであるヒト Chk1 および Cds1 をクローニングし、さらに哺乳動物における Chk1、Cds1 の *in vivo* での機能を解明するためにノックアウトマウスの作成を行った。Chk1 ノックアウトマウスが誕生しないことから、今年度は胎生致死の原因をゲノムの安定性との関連で明らかにした。また、Cds1 (Chk2) ノックアウトマウスを作成して機能を解析するとともに、p53 との関連を調べる目的で p53 ノックアウトマウスとの交配を行っている。さらに、ストレス応答に中心的な役割を担う転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化する新規のキナーゼ NAK (NF- $\kappa$ B-activating kinase) の IKK 活性化メカニズムを解明した (Tojima Y, Fujimoto A et al. *Nature* 2000 in press)。

## B. 研究方法

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。両ノックアウトマウスとも、p53 ノックアウトマウスと交配を行っている。

リコンビナント蛋白は、バキュロウイルスベクターを用いて、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。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。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。

NAK や IKK $\beta$  は、293T 細胞に transfection を行い、kinase assay や immunoblot 解析した。NF- $\kappa$ B の転写活性および DNA 結合能は、luciferase と EMSA (electrophoretic mobility shift assay) を用いて測定した。

## C. 研究結果と考察

### 1. Chk1 KO マウスの作成と Chk1 キナーゼの *in vivo* における機能解析

我々は、昨年度までの研究で、ヒト Chk1 遺伝子をクローニングし、細胞周期特異的に発現することを報告した (Kaneko Y et al. *Oncogene* 1999)。引き続き Chk1 キナーゼの個体レベルにおける機能を解明する目的でノックアウトマウスを作成した。Chk1 $-/-$ マウスは誕生せず、embryonic lethal であることが判明した。さらに胎生期をさかのぼって調べたところ、胎生 7.5 日においても  $-/-$  embryo は生存せず、胎生 3.5 日にはメンデルの法則から予測される 1 : 2 : 1 の割合で  $+/+$ 、 $+/-$ 、 $-/-$  が認められた

ことから、胎生 3.5 日と 7.5 日の間に死亡するものと結論した。

初期胚の DNA を DAPI で染色したところ、 $+/-$  に比較して  $-/-$  embryo では核の凝縮と断片化が著名であった。胎生期 3.5 日の blastocyst を *in vitro* で 4 日間培養し観察すると、 $-/-$  embryo は正常に hatch し trophoblast giant cell も認められた。一方、将来胎仔になる inner cell mass (ICM) はまったく発育しなかった。以上の結果は、初期の embryo の発育に Chk1 が必須の役割を果たすことを示唆する。

次に Chk1  $-/-$  embryo の死亡の原因を、チェックポイント機能との関連で解析した。Aphidicolin で DNA 合成を阻害すると、 $-/-$  における核の断片化がさらに増強したことから、複製停止に対するチェックポイント機構が  $-/-$  embryo で欠損してい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リン酸化ヒストン H3 に対する特異的抗体で染色した。 $+/+$  および  $+/-$  embryo では、複製チェックポイントが正常に働いてリン酸化ヒストン H3 がまったく認められなかったのに対して、 $-/-$  embryo ではかなりの割合でリン酸化ヒストン H3 が染色されたことから、複製が停止しているにもかかわらず異常に M 期に進入したものと解釈される。実際、ヒト正常線維芽細胞を aphidicolin あるいは hydroxyurea (HU) で処理して DNA 合成をブロックすると、Chk1 蛋白のリン酸化によるバンドシフトが認められたことから、複製停止に

反応して hChk1 がリン酸化を受けて活性化される可能性が考えられた。以上の成績をまとめると、Chk1 は *in vitro* のみならず *in vivo* においても複製チェックポイントに関わっており、Chk1  $-/-$  マウスでは、複製が完全に終了する前に M 期へと進行した結果、核の断裂化を起こし lethal になるものと理解される。

本来 Chk1 は酵母の系において、DNA 傷害チェックポイントに関わっていることが示されており、我々も Chk1 KO embryo を用いて電離放射線や紫外線照射に対する反応を検討した。その結果、aphidicolin の場合と同様に、電離放射線や紫外線を当てて DNA 傷害を起こすと、Chk1  $+/+$  および  $+/-$  embryo では G2 チェックポイントが正常に作動したが、 $-/-$  embryo においてはチェックポイント機構が作動せず、M 期に進行してしまい、リン酸化ヒストン H3 が検出された。したがって、Chk1 は、DNA 複製の停止や DNA の傷害に対して、修復などを作動させゲノムの integrity を保つために細胞周期を一旦停止させるチェックポイント制御にきわ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, Tominaga K et al. *Nature Cell Biol* in revision)。あとで述べるように、Cds1 (Chk2) も DNA 傷害チェックポイントに関わっているが、Chk1 KO マウスが胎生致死であることから、少なくとも胎生初期の細胞周期がきわめて短い状況では、Chk1 機能を Chk2 (Cds1) が相補できないものと考えられる。また、最近 ATM ファミリーに属する ATR のノックアウトマウスが

作成され、Chk1 KO と同じく胎生早期に致死となることが報告されている (*Genes & Dev* 2000) ことと考え合わせ、あるストレスに対しては Chk1 が ATR の下流で働いている可能性が考えられる。

Chk1 KO マウスが胎生致死となることから、老化における Chk1 キナーゼの役割はホモマウスを用いては解析できなくなったが、現在ヘテロマウスに低用量の電離放射線を照射し、その後の寿命や発癌に対する影響を追跡調査中である。また、Cre-lop P 系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、ある特定の組織における Chk1 の役割を解析する予定である。

## 2. ヒト Cds1 キナーゼの機能解析

我々は昨年度の研究で、ヒト Cds1 遺伝子をクローニングし、DNA 傷害に対するチェックポイント機構に関わっていることを明らかにした (Tominaga K, Morisaki H et al. *J Biol Chem* 1999)。hCds1 蛋白は電離放射線や紫外線による DNA 傷害に反応してリン酸化を受け、活性化されることを明らかにした。活性化 hCds1 は Cdc25C の 216 番目のセリン残基をリン酸化し、このフォスファターゼを不活化することにより、Cdc2 を不活化し細胞周期を G2 期で停止させるものと理解される。

重要なことに、AT 由来の細胞においては、電離放射線に対する hCds1 のリン酸化は特異的に障害されており、これが AT 細胞における放射線感受性の分子基盤になっていることが示された。

さらに、hCds1 の発現が p53 によって制

御されているという興味深い成績も得た (Tominaga K, Morisaki H et al. *J Biol Chem* 1999)。すなわち、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た。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、hCds1 は新たな癌治療のターゲットとなる可能性がある。

本年度は Cds1 の個体における機能を解明する目的で、ノックアウトマウスを作成した。ヘテロマウスは、外見上 wild type とまったく変化なく、p53 との機能的な interaction を見るために、すでに p53 KO マウスと交配を開始している。また、Cds1 -/- の ES 細胞を樹立しており、ES 細胞では p53 が機能していないため、放射線照射に対して、G1 arrest が起こらないが、G2 arrest は Cds1 -/- 細胞においても認められたことから、Cds1 以外の遺伝子が G2 checkpoint に関わっている可能性がある。さらに、13.5 日の embryo から Cds1 -/- MEF (mouse embryo fibroblast) を樹立し、現在 checkpoint 機能、p53 のリン酸化などを解析中である。Cds1 -/- マウスは、3 月末に生まれる予定であるが、Cds1 -/- MEF の経験から、Chk1 KO と異なり、Chk2 (Cds1) KO マウスは少なくとも胎生 13.5 日までは生存していることが確実である。

### 3. IKK をリン酸化し NF- $\kappa$ B を活性化する新規キナーゼ、NAK の同定

昨年の研究で我々は、I $\kappa$ B キナーゼ (IKK) 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 NAK (NF- $\kappa$ B-activating kinase) をクローニングした。NAK の IKK $\alpha$  および IKK $\beta$  とのホモロジーは約 30-50% である。NAK の組織分布を Northern プロットで解析したところ、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。

本年度は、NAK による NF- $\kappa$ B 活性化のメカニズムの解明を試みた。NAK は、*in vivo* において I $\kappa$ B のセリン 32 をリン酸化し、これは dominant negative IKK $\beta$  によって抑制されたことより、NAK は IKK $\beta$  を介して I $\kappa$ B をリン酸化することが示唆された。*In vitro* では、NAK は、I $\kappa$ B のセリン 36 はリン酸化したが、セリン 32 はリン酸化しなかった。Wild type NAK は、IKK $\beta$  の activation loop のセリン残基をリン酸化したが、kinase inactive NAK はしなかった。

以上の結果より、NAK は IKK としてではなく、IKK をリン酸化するキナーゼである可能性がより考えられた。実際、recombinant NAK は不活性型の IKK complex を活性化するが、p38 MAP kinase や JNK は活性化しないことがわかった。さらに、NAK は IKK $\beta$  と共発現すると、レポーター assay で測定した NF- $\kappa$ B の転写機能と DNA 結合能を著名に増強することが示された。IKK $\beta$  による NF- $\kappa$ B の転写活性化は、NAK によって阻害されなかったが、

NAK による活性化は dominant negative IKK $\beta$ によって抑制されたことから、NAK は IKK $\beta$ の上流で機能すると結論づけられた。実際、IKK $\beta$ -/-細胞ではNAKによるNF- $\kappa$ B 活性化が障害されていた。NAK を活性化する細胞外シグナルについては今後詳細な検討が必要であるが、これまでの解析から PKC $\epsilon$ の下流で働くことが示唆された。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、老化の原因として、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っているものと考えられる。なかでも、NF- $\kappa$ B は、外界からのさまざまな刺激に应答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り、NAK は NF- $\kappa$ B を活性化する新たな経路として注目される。

#### D. 結論

早老症の原因遺伝子 ATM の下流で働き、genome stability に重要な働きをする二つの checkpoint 遺伝子、hChk1 キナーゼと hCds1 (hChk2) キナーゼの機能解析を行った。Chk1 は、ノックアウトマウスでの解析から、DNA 傷害に対するチェックポイントと複製チェックポイントに、一方、Cds1 は DNA 傷害チェックポイントにおいて機能することが明らかとなった。Chk1 ノックアウトマウスは 3.5 から 7.5 日の間に致死となることから、Chk1 の複製およびDNA 傷害チェックポイント機能が、胎生初期の受精卵の分裂・発達に必須であることが示

唆された。一方、Cds1 (Chk2) は主として電離放射線や紫外線などによりもたらされたDNA 傷害に反応して活性化され、DNA 傷害チェックポイントにおいて機能するとの結果が得られた。

NF- $\kappa$ B の活性化に関わる新規遺伝子 NAK を同定した。NAK は、I $\kappa$ B キナーゼ (IKK $\beta$ ) をリン酸化・活性化することにより、NF- $\kappa$ B の転写機能を活性化し、ストレス応答反応に関わっているものと思われる。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tojima Y, Fujimoto A, Delhase M, Chen Y, Hatakeyama S, Nakayama K, Kaneko Y, Nimura Y, Motoyama N, Ikeda K, Karin M, Nakanishi M NAK, a novel I $\kappa$ B kinase-activating kinase. Nature 2000 in press
2. Takai H, Tominaga K, Motoyama N, Nagahama H, Ikeda K, Nakanishi M, Nakayama K, Nakayama K-I Aberrant DNA replication checkpoint function and early embryonic death in Chk1-/- mice. Nature Cell Biol 2000 in revision
3. Yamamoto A, Hashimoto Y, Kohri K, Ogata E, Kato S, Ikeda K, Nakanishi M Cyclin E as a co-activator of androgen receptor. Genes & Dev 2000 in revision.

- 4 . 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.
- 4 . Tominaga K, Morisaki H, Fujimoto A, Takana T, Ohtsubo M, Hirai M, Okayama H, Ikeda K, Nakanishi M. Role of Cds1 (Chk2) kinase in DNA damage checkpoint and its regulation by p53. *J Biol Chem* 274: 31463-31467, 1999
- 5 . Morisaki H, Ando A, Nagata Y, Pereira-Smith O, Smith JR, 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
- 6 . Nakanishi M, Kaneko Y, Matsushime H, Ikeda K. Direct interaction of p21 cyclin-dependent kinase inhibitor with the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Biochem Biophys Res Commun* 263: 35-40, 1999
- 7 . Yamada Y, Hosoi T, Makimoto F, Tanaka H, Seino Y, Ikeda K. TGF- $\beta$ 1 gene polymorphism and bone mineral density in Japanese adolescents. *Am J Med* 106: 477-479, 1999
- 8 . Yamada Y, Harada A, Hosoi T, Miyauchi A, Ikeda K, Ohta H, Shiraki M: Association of transforming growth factor  $\beta$ 1 genotype with therapeutic response to active vitamin D for postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 15: 415-420, 2000.
- 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- $\kappa$ 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, Tominaga K, Motoyama N, Ikeda K, Nakanishi M, Nagahama H, Nakayama K, Nakayama K-I. 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, Takai H, Tominaga K, Nakayama K, Nakayama K, Ikeda K,

Nakanishi M Chk1 and Cds1 (Chk2) checkpoint genes in the cellular response to DNA damage. Gordon Research Conferences, Biology of Aging, Jan 31-Feb 4, 2000, Ventura, CA, USA

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

6. 高井裕之、富永 薫、本山 昇、池田 恭治、中西 真、永濱裕康、中山敬子、

中山敬一 Chk1 欠損マウスを用いたマウス Chk1 キナーゼの機能解析 第37回日本臨床分子医学会学術総会 平成12年3月10—11日、東京

#### 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

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

レトロウイルスを利用した発現クローニング法の開発と応用に関する研究

分担研究者 北村 俊雄 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

レトロウイルスを利用した種々の発現クローニング法を開発し、いくつかの興味する新規遺伝子を同定し解析を行っている。

キーワード： レトロウイルス、シグナルシーケンス、  
遺伝子クローニング、GFP

A. 研究目的

ゲノムプロジェクトが進み、数年以内に10万種類位あるといわれているヒト遺伝子がすべてクローニングされることが予想される。次に重要になってくるのは、それぞれの遺伝子産物である蛋白質の機能を調べることである。未知の蛋白質の機能を知るためには、通常、既知の蛋白質との構造的類似性からある程度機能を類推し機能解析が行われる。しかしながら、新規分子で既知の蛋白質との相同性がまったくない場合には機能解析の手掛かりが少ない。そのような場合には、逆に目的とする蛋白質の機能を指標にして遺伝子を検索する方法が有効である。この方法では、遺伝子から蛋白質を発現して、目的の機能を有する遺伝

子を検索するため、一般に発現クローニング法と呼ばれる。

最初の発現クローニング法は、大腸菌内で蛋白質を発現し、抗体に対する反応を指標に遺伝子をクローニングする方法であった。この方法の欠点は、大腸菌で産生した蛋白質には糖鎖が付加されないこと、スクリーニングの方法が限定されることであった。その後、アフリカツメガエルの卵細胞に mRNA を注入して蛋白質を作らせる方法、さらに COS 細胞と呼ばれるサルの腎臓由来の細胞株にライブラリーを導入して、細胞上清に分泌される蛋白質の活性で遺伝子をスクリーニング方法が開発された。特に、COS 細胞を利用した方法は、哺乳動物細胞内でプラスミドベクターを増幅させ



ることに初めて成功したものとして画期的であった。その後、発現クローニング法には種々の改良が加えられ多くの遺伝子がクローニングされた。しかしながら、これらの方法の欠点は、蛋白質の一過性の発現のみを扱うため、スクリーニングの方法が極端に制限されることであった。

我々が開発したレトロウイルスベクターを利用した発現クローニング法 (Kitamura et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995) は、従来の発現クローニング法における上述の欠点を解決した。遺伝子導入にレトロウイルスベクターを利用することによって、いろいろな細胞を標的細胞として利用できることに加え、一度ウイルス感染が成立するとウイルスベクターが運ぶ遺伝子はゲノムに挿入され、その発現は長期に亘って安定である。そのため、多様なアッセイ系による遺伝子スクリーニングが可能になった。後述するように、レトロウイルスを利用した発現クローニング法の応用範囲は広く、本研究では、以下に示すようなさまざまな方法論で老年病や老化に関わる遺伝子の同定を目指している。

## 1. 蛋白質機能を指標に行う発現クローニング法

研究分担者らが開発した方法 (Kitamura et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995) を利用して細胞分化・増殖や細胞周期に関与する蛋白質をスクリーニングする目的で実験を行っているが、本年度は細胞増殖を抑制し細胞分化を誘導する新規 RacGAP 遺伝子をした。解析の結果、細胞周期の G2/M

期にその発現が上昇することが判明したのでこの GAP 蛋白質が細胞分裂においてどのような働きをするかを調べるのが本研究の目的である。

## 2. シグナルシーケンストラップ法 (SST-REX)

昨年開発した新しいシグナルシーケンストラップ法 (Kojima and Kitamura, *Nature Biotechnology*, 1999) を利用して種々の細胞から膜蛋白質および分泌蛋白質の cDNA のクローニングを行なっている。シグナルシーケンストラップ法を利用して膜蛋白質および分泌蛋白質に焦点をあてている理由は、細胞外に発現される蛋白質が細胞間の情報伝達に重要な役割を果たすからである。脂肪組織は体内最大の臓器といえるが、従来は脂肪およびエネルギーの蓄積場所として以外の生理的な役割はあまり考えられていなかった。しかしながら 1994 年に遺伝的肥満マウス (ob/ob) の責任遺伝子としてクローニングされたレプチンが脂肪細胞から産生されるサイトカインであることが判明して以来、脂肪組織はサイトカインの産生部位として新たな注目を集めている。脂肪細胞から産生されたレプチンは、中枢神経系の視床下部付近に作用して食欲を抑制し脂肪の蓄積を妨げるというフィードバック機構を介して、生体のホメオスターシスを保つ役割を果たす。レプチン遺伝子が欠損する ob/ob マウスではこのフィードバックが消失することが病的肥満の原因となる。栄養摂取過多などにより脂肪組織が増大するときには、レプチンのよう

な食欲抑制を介した調節を司る因子以外に、直接脂質代謝系を改善するような作用を有するサイトカインも重要な働きをする可能性がある。一方、ヒトの病的肥満では、レプチン遺伝子が欠損しているという報告はほとんどなく、レプチン様の作用を持つ他のサイトカインが存在するかも知れない。これら脂肪組織のホメオスターシスを保つ作用を有する一群の分泌蛋白質を脂肪細胞からクローニングできれば、病的肥満や種々の脂質代謝異常の病態の解明および治療に役立つことが期待できる。脂肪細胞から分泌されるサイトカインなど細胞外に分泌される蛋白質の cDNA をクローニングし、これらの分泌蛋白質の脂質代謝における生理作用および種々の病態における脂質代謝異常への関与を調べる。

研究分担者らは昨年度 3T-3L1 細胞からシグナルシーケンストラップ用の cDNA ライブラリーを作成し、スクリーニングを行うことによっていくつかの新規遺伝子をクローニングした。今年度は、脂肪細胞分化に伴い発現が上昇する 4 つのクローンについて全長 cDNA をクローニングして解析中である。この研究は、老化に伴う体内における脂肪細胞の増大のメカニズムを解明し、動脈硬化、高血圧、糖尿病などを防ぐことを最終目的にしている。

### 3. 細胞内局在によって蛋白質の cDNA をクローンする方法 FL-REX

本年度は蛍光蛋白質 GFP と cDNA の融合ライブラリーを利用して細胞内局在で蛋白質のクローニングを行う方法 (Misawa et

al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 印刷中) を樹立した。この方法を利用して新規転写因子などを同定したが、本実験の最終目標は細胞分裂期にダイナミックに動く蛋白質や UV 照射など外部からのストレスに反応して細胞内局在が変化する蛋白質を同定することである。この研究は研究代表者の Chk-1 および Cds-1 による細胞分裂期チェックポイントの研究を相補すると考えられる。

### B. 研究方法

我々はこれまでに効率の良いレトロウイルスベクター系を開発し、レトロウイルスによる発現クローニング法を樹立してきた。更に PCR による任意突然変異導入とレトロウイルス発現スクリーニング系を組み合わせることによって、サイトカインレセプター MPL と転写因子 STAT5 の活性型変異体を同定した (Onishi et al. *Blood*, 1996; Onishi et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1998)。

本実験においてはレトロウイルスベクターを利用した cDNA ライブラリーの機能的スクリーニングを基礎として以下の 3 つの方法論で細胞周期や老化に関与する新規遺伝子の同定を試みた。

#### 1. 全長 cDNA ライブラリーの機能的スクリーニング (Kitamura et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995)

レトロウイルスベクターを利用した機能的発現クローニングの原理は、レトロウイルスベクターで作成した cDNA ライブラリーを細胞に感染させ、細胞の機能の変化を指標にして細胞を選別し、選別された細胞

からPCRでcDNAを回収することである。このようにレトロウイルスベクターをライブラリー導入に使用することによって従来の方法と比べて2つの大きな利点がある。1つは種々の細胞を標的細胞として選ぶことが可能になることである。またもう1つの利点は、レトロウイルスベクターによって導入された遺伝子の発現は一度感染が成立すると安定で、さまざまな機能アッセイがスクリーニングに利用できることである。本年度は、マウス白血病 M1 細胞の cDNA ライブラリーをレトロウイルスベクターで作成し、M1 細胞の分化増殖など細胞周期に影響を与える遺伝子の同定を試みた。

2. レトロウイルスベクター pMX-SST を利用したシグナルシークエンストラップ法 SST-REX (Kojima and Kitamura, *Nature Biotechnology*, 1999)。

SST-REX 法の樹立には、研究分担者らが以前に同定した恒常的活性型 MPL (MPL\* : Onishi et al. *Blood* 1996) を利用した。MPL\*は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細胞に自律増殖能を賦与する。実験の原理は以下のとおりである。まず MPL\*の細胞外部位欠失変異体 $\Delta$ MPL\*と cDNA 断片を融合したライブラリーをウイルスベクターで作成し、ウイルス感染により IL-3 依存性 Ba/F3 細胞にライブラリーとして導入する。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- $\Delta$ 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。感染後、IL-3 非存在下で自律増殖する Ba/F3 クローンを選別し、これらのクローンに挿入された cDNA を PCR で回収することによって、膜蛋白質および分泌蛋白質の cDNA をスクリーニングする。

SST-REX 法は、従来のシグナルシークエンストラップ法に比べ、ソーティングなど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%以上のものでシグナル配列を含んでおり従来の方法に比べ実験精度においても大変優れている。SST-REX 法を利用して脂肪細胞に分化させた 3T3-L1 細胞やラット脳の cDNA ライブラリーをスクリーニングして新規遺伝子をスクリーニングした。

3. cDNA-GFP の融合ライブラリーを利用し細胞内局在で蛋白質を同定する方法 FL-REX (Misawa et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000 印刷中)。

FL-REX 法では、cDNA 断片を GFP (green fluorescent protein) の cDNA と融合させたライブラリーをレトロウイルスベクター pMX-FL を利用して作成する。このライブラリーを NIH3T3 細胞に発現させ、GFP 融合産物の細胞内局在を蛍光顕微鏡下で観察し、目的の細胞内局在を示す細胞を単離する。単離した細胞から PCR によってレトロウイルスベクターで挿入されている cDNA-GFP を回収し解析すれば、細胞内局在によって cDNA を同定することが可能である。FL-REX 法を利用して種々のライブラリーから新規転写因子などを同定した。

## C. 研究成果

以下に3つのアプローチによる研究について現在までの進行状況を述べる。

### 1. 蛋白質本来の機能を指標としたスクリーニング法による遺伝子の発現クリーニング

研究分担者が、レトロウイルスを利用した発現クローニング法で分化を誘導する遺伝子として単離した cDNA は Rac/cdc42 特異的 GAP であった (Kawashima et al. 論文投稿中)。

部分的配列がヒトで MgcRacGAP として発表されていたが、分担者のグループでクローニングしたマウスおよびヒトの MgcRacGAP は発表されているものより N 末端が約 100 アミノ酸長く、完全長のものと思われた。この 100 アミノ酸の部分は、ミオシン様ドメインで後述のように MgcRacGAP の作用に重要であった。ヒト白血病細胞株 HL60 に MgcRacGAP を過剰発現すると増殖が抑制され、マクロファージ系細胞に分化した。しかしながら内因性 MgcRacGAP の発現は逆に細胞の増殖速度と正の相関を有する場合が多く、HL60 や M1 が TPA や IL6 に反応してマクロファージに分化して増殖しなくなると内因性 MgcRacGAP の発現は消失する。また MgcRacGAP を過剰発現した場合、細胞増殖が抑制されるとともに多核の細胞が出現することも観察された。これらの実験結果から、MgcRacGAP が細胞周期の G2/M 期において重要な働きをする可能性を考えた。そこで HeLa 細胞で細胞周期を同期して、

MgcRacGAP の発現量の変化を調べたところ、予想どおり細胞周期 G2/M 期に有意に高いことが判明した。さらに MgcRacGAP の N 末端の欠失変異体や、GAP 活性陰性の変異体を強制発現すると多核の細胞の出現頻度が高まった。最近、MgcRacGAP に対する抗体を作成し細胞内局在を調べたところ、染色体、紡錘体、収縮輪などに発現し、細胞周期 M 期でダイナミックな動きをすることが判明した (Hirose et al. 論文準備中)。また細胞周期によって MgcRacGAP のゲル上の見かけの大きさが変化することから、MgcRacGAP が M 期のチェックポイントに働くと考えられるセリン/スレオニンリン酸化酵素 Chk-1 や Cds-1 の基質となる可能性も考え、今後研究代表者のグループと共に解析を行う予定である。

### 2. SST-REX 法による膜蛋白質および分泌蛋白質の同定

SST-REX 法を利用して、各種細胞から新規のサイトカインレセプター、サイトカイン様分子などをクローニングし解析中であるが、老化に関連する可能性のあるものとして脂肪細胞から同定した4種類の新規分子およびラット脳から同定した新規 TNF レセプターファミリー分子がある。

3T3-L1 細胞から同定した新規の膜蛋白質あるいは分泌蛋白質7分子のうち、4つは脂肪細胞の分化に伴いその発現が増加する分子であった。そのうち1つの分子は皮下脂肪に比べ内臓脂肪での発現が有意に高く、成人病発症との関係あるいは相関に興味を持たれる。現在までにこれら4分子の

全長 cDNA をほぼ取得し、cDNA の構造解析を行っている。

一方、脳からクローニングした TNF レセプターファミリーに属する新規レセプター分子 Troy は、リガンドは現時点では不明だが、表皮細胞に限局した特徴的な発現分布を示すため注目している。Troy は脳の神経上皮細胞、皮膚、眼球結膜、胃粘膜上皮、気管上皮など、上皮細胞に特異的に発現されている。最近報告された毛根に特異的な発現を示す Edar と呼ばれる TNF レセプターファミリー分子と相同性を示す点も興味を引く。Edar は毛根に発現していることが報告されているが、Troy もまた毛根に発現していることを最近確認した。2つのレセプターの機能の関連性などに興味を持たれる。さらに Troy 遺伝子の染色体上の位置が、表皮や毛に異常のあるマウス遺伝病 Wc (waved coat) の遺伝子座の非常に近くに存在し、Troy 遺伝子自体が Wc の原因遺伝子である可能性もある。今後、脱毛、皮膚の退縮など、老化との関係も含めて Troy の機能を調べる予定である。現在、Troy のリガンドの探索を進めると並行して可溶型 Troy を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し、Troy の機能解析をめざしている。

### 3. FL-REX 法の開発と応用

本年度は GFP 融合蛋白質を利用して、細胞内局在で蛋白質の cDNA をクローニングする方法 FL-REX 法 (Misawa et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 印刷中) を樹立した。この方法を利用して、細胞周期の M

期においてダイナミックに動く蛋白質を同定し、M 期のチェックポイントおよび進行のメカニズムの研究を展開することを試みている。しかしながら、実験に使用している NIH3T3 細胞が M 期において細胞が丸く浮き上がるような形態になり、細胞内部の GFP の局在が判定しにくいという技術的な問題点が残されている。現在までに FL-REX 法で新規転写因子様分子を同定し解析中であるが、老化関連あるいは細胞周期関連遺伝子の同定には至っていない。

### D. 考察

レトロウイルスを利用した発現クローニング法を工夫して、蛋白質の機能・性質を指標に cDNA をクローニングするという研究の流れのなかで、成人病・老化・細胞周期に関与する可能性がある新規遺伝子を複数同定し、その機能を解析中である。

HL60 細胞のマクロファージ系細胞への分化を誘導する分子として同定した MgcRacGAP は、現在までの解析から、細胞分裂 M 期の進行に重要な遺伝子であることが示唆されている。この分子の強制発現が増殖を抑制し、分化を誘導することと、M 期の進行との関係に興味を持たれる。

また、本年度樹立した FL-REX 法をさらに進展させ、細胞外からの特定の刺激 (サイトカイン刺激、UV 照射など) に反応してその局在が変化する蛋白質を同定するという方向の、より蛋白質の機能を考えたアプローチを取り入れていく予定である。この実験系がうまく動けば、UV 照射後の DNA 修復に関与するシグナル伝達の研究

などにユニークなアプローチができることが予想され、研究代表者が ATM、Chk-1、Cds-1 を中心に展開している M 期のチェックポイントの研究とも、うまく相補しあうことが期待できる。

#### E. 結論

レトロウイルスベクターを利用した機能的クローニング法で、老化あるいは細胞周期に関係する可能性のある新規遺伝子をいくつか同定し解析中である。現在までに以下のような知見を得た。

まず、機能的スクリーニングで、細胞分化を誘導する分子として同定した MgcRacGAP は、細胞分裂 M 期において重要な働きをすることが、明らかになった。

分化誘導した 3T3-L1 細胞から SST-REX 法によって同定した新規膜蛋白質は、3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化に伴いその発現が増加した。

ラット脳由来 cDNA ライブラリーから新規 TNF レセプターファミリー分子 Troy を同定した。Troy は神経上皮細胞や皮膚を初めとして、上皮細胞特異的に発現が認められた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yamada, K., Ariyoshi, K., Onishi, M., Miyajima, A., Hayakawa, F., Towatari, M., Saito, H., Oka, Y., Asano, S., Nosaka, T. and Kitamura, T. (2000) Constitutively active STAT5A and STAT5B in vitro and in

vivo: mutation of STAT5 is not a frequent cause of leukemogenesis. *Int. J. Hematol.* 71, 46-54.

2) Kitamura, T., and Morikawa, Y. (2000) Isolation of cDNAs for T cell antigens by retrovirus-mediated expression cloning. *T Cell Protocols, Methods in Molecular Biology.* (Kearse, K.P. ed. Humana Press, Totowa, New Jersey) pp 143-152.

3) Hayakawa, F., Towatari, M., Kiyoi, H., Tsuzuki, S., Iida, H., Kitamura, T., Saito, H., and Naoe, T. (2000) Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3 dependent acute myeloid cell lines. *Leukemia* in press.

4) Zhao, M., Kiyoi, H., Yamamoto, Y., Ito, M., Towatari, M., Ohmura, S., Kitamura, T., Ueda, R., Saito, H., and Naoe, T. (2000) In vivo treatment of mutant FLT-3-transformed murine leukemia with a tyrosine kinase inhibitor. *Oncogene* in press.

5) Nosaka, T., and Kitamura, T. Jaks and STATs in hematopoietic cells. (2000) *Int. J. Hematol.* in press.

6) Fujio, K., Nosaka, T., Kojima, T., Kawashima, T., Yahata, T., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Yamamoto, K., Nishimura, T. and Kitamura, T. (2000)

- Molecular cloning of a novel type I cytokine receptor. *Blood* in press.
- 7) Misawa, K., Nosaka, T., Kojima, T., Hirai, M. and Kitamura, T. (2000) Molecular cloning and tissue distribution of a mouse homologue of human LIGHT, a member of TNF super family. *Cytogenetics and Cell Genetics* in press.
- 8) Misawa, K., Morita, S., Nosaka, T., Kaneko, A., Nakahata, T., Asano, S. and Kitamura, T. (2000) A novel method to identify cDNAs based on localization of the GFP-fusion products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* in press.
- 9) Morita, S., Kojima, T., and Kitamura, T. (2000) An efficient and stable retrovirus packaging system for transient packaging. *Gene Therapy* in press.
- 10) 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 Rmcl. *Nature Genetics* 21, 216-219.
- 11) 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* 6 (Abraham N.G. et al. eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York) pp277-287.
- 12) 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.* 11, 259-268.
- 13) Matsumura, I., Kitamura, T., Wakao, H., Hashimoto, K., Albanese, C., Downward, J., Pestell, R.G., and Kanakura, Y. (1999) Involvement of cyclin D1 in STAT5-mediated cell growth. *EMBO J.* 18, 1367-1377.
- 14) Nieborowska-Skorska, M., Wasik, M.A., Slupianek, A., Salomoni, P., Kitamura, T., Calabretta, B., and Skorski, T. (1999) Signal transducer and activator of transcription (STAT) 5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH) 3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis. *J. Exp. Med.* 189, 1229-1242.
- 15) Kojima, T., and Kitamura, T. (1999) A novel signal sequence trap method using retrovirus-mediated gene transfer. *Nature Biotechnol.* 17, 487-490.

- 1 6 ) 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.* 27, 1063-1076.
- 1 7 ) Shimizu, N., Soda, Y., Kanbe, K., Jinno, A., Kitamura, T., and Hoshino, H. (1999) An orphan G protein-coupled receptor, GPR1, act as a determinant co-receptor allowing replication of human immunodeficiency virus type 1 and type 2 in brain-derived cells. *J. Virol.* 258, 5231-5239.
- 1 8 ) Soda, Y., Shimizu, N., Jinno, A., Liu, H.Y., Kanbe, K., Kitamura, T., and Hoshino, H. (1999) Establishment of a new system for determination of coreceptor usages of HIV based on the human glioma NP-2 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 313-321.
- 1 9 ) Nosaka, T., Kawashima, T., Misawa, K., Ikuta, K., Mui, A.L.F. and Kitamura, T. (1999) STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation, and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J.* 18, 4754-4765.
- 2 0 ) Ye, S.K., Maki, K., Kitamura, T., Sunaga, S., Akashi, K., Domen, J., Weissman, I.L., Honjo, T. and Ikuta, K. (1999) Induction of germline transcription in the TCRg locus by Stat5: implications for accessibility control by the IL-7 receptor. *Immunity* 11:213-223.
- 2 1 ) Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Komeda, K., Satoh, S., Nakano, R., Ishii, C., Sugiyama, T., Eto, K., Tsubamoto, Y., Okuno, A., Murakami, K., Sekihara, Hi., Hasegawa, G., Naito, M., Toyashima, Y., Tanaka, S., Shiota, K., Kitamura, T., Fujita, T., Ezaki, O., Aizawa, S., Nagai, R., Tobe, K., Kimura, S., and Kadowaki, T. (1999) PPAR $\alpha$  mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Molecular Cell* 4: 597-609.
- 2 2 ) Tsukamoto, T., Huang, T., Guzman, R.C., Chen, X., Pascual, R.V., Kitamura, T., and Nandi, S. (1999) Isolation of oncogenes from rat mammary tumors by a highly efficient retrovirus expression cloning system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 7-12.
- 2 3 ) 北村俊雄、三沢和秀 (2000) 細胞内局在を利用した遺伝子クローニング法 FL-REX 実験医学 印刷中



2 4) 北村俊雄 (2000) 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 SST-REX 分子細胞治療 印刷中

2 5) 北村俊雄 (2000) レトロウイルスを利用した新しい研究法 細胞工学 印刷中

2 6) 北村俊雄 (2000) 細胞への遺伝子導入法: レトロウイルスベクターを中心として 内分泌糖尿病科 印刷中

2 7) 北村俊雄 (2000) 造血因子レセプターとシグナル伝達 造血サイトカインの研究と臨床応用 (メデイカルレビュー社) 印刷中

2 8) 北村俊雄 (1999) レトロウイルスによる遺伝子導入法とその応用 新遺伝子工学ハンドブック (羊土社) p210-215.

2 9) 小嶋哲郎、北村俊雄 (1999) レトロウイルスを利用した新しいシグナルシーケンストラップ法 SST-REX 実験医学 17, 2313-2316.

## 2. 学会発表

1) Constitutive activation of STAT5 by a point mutation in the SH2 domain. Ariyoshi, K., Nosaka, T., Yamada, K., Onishi, M., Miyajima, A., and Kitamura, T. (Keystone Symposia, Colorado, April 1999)

2) SH2 ドメイン内の点突然変異による STAT5 の恒常的活性化 有好浩一、野阪哲哉、山田耕司、北村俊雄(第 61 回 日本血液学会、東京、平成 11 年 4 月)

3) 恒常的活性型 STAT5A を用いた造血細胞の増殖および分化における STAT5A の役割の検討 川島敏行、村田健、野阪哲哉、北村俊雄 (第 61 回 日本血液学会、東京、平成 11 年 4 月)

4) 活性型分子を用いた STAT5 の機能解析: STAT5 は細胞増殖、分化、アポトーシスを誘導する 野阪哲哉、大西真由美、有好浩一、川島敏行、北村俊雄 (第 22 回 日本分子生物学会、横浜、平成 11 年 12 月)

5) レトロウイルス系を利用したシグナルシーケンストラップ法による新規脂肪細胞特異的遺伝子の単離 敦賀弘道、小嶋哲郎、北村俊雄 (第 22 回 日本分子生物学会、横浜、平成 11 年 12 月)

## 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  
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)

以上特許出願中

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)