

---

平成 12 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 13 年 3 月

主任研究者 本 山 昇

平成 12 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 13 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

長寿及び生体ストレス関連遺伝子の発現を制御していると考えられる線虫Daf-16のマウスホモログFKHRL1のゲノムDNAを単離し、ターゲ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。このコンストラクトを用いてヘテロマウスの作成に成功した。また、活性型AFXを発現誘導可能なマウス筋芽細胞C2C12細胞株の樹立に成功し、AFXが細胞周期制御因子p27kip1の発現を促進し細胞周期をG1の停止させるとともに、G2/Mにも停止させることを明らかにした。また、筋分化においては、AFXは分化を抑制することを見出した。また、DNAチップ技術を用いてAFXの標的遺伝子の探索・同定を試みている。また、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Chk2キナーゼのノックアウトマウスの作成に成功した。Chk2ノックアウトマウスはX線照射に対して耐性を示した。この放射線耐性はリンパ球の放射線抵抗性の結果であると考えられた。また、胸腺細胞・神経細胞も放射線抵抗性を示した。放射線が引き起こすこれらの組織のアポトーシスには、p53が必須であることが知られている。そこで、放射線処理後、p53タンパク

質の細胞内含量の変化を検討したところ、Chk2<sup>-/-</sup>胸腺細胞では、p53 タンパク質の増加が Chk2<sup>+/+</sup>胸腺細胞に比べて幾分抑制されていた。一方、p53 タンパク質の転写活性を検討したところ、放射線処理により p53 ターゲット分子である p21、Noxa mRNA の発現誘導がほとんど見られなかった。以上の成績は、DNA 傷害に応じた安定化に加え、Chk2 は p53 タンパク質の活性化に必要であると考えられた。

<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>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</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>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</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>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</p>
<p>A. 研究目的</p>	<p>老化の過程では、紫外線・電離放射線等</p>	<p>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</p>

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- $\kappa$ 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 マウスホモログの機能解析

(1) Daf-16 のマウスホモログ FKHL1 の gain-of-function および loss-of-function マウスの作成

マウス AFX cDNA の 5'側に FLAG の tag をつけた。また、Akt よってリン酸化される 3カ所の部位を alanine に置換した活性型変異体遺伝子を PCR よって作製した。

(これらをマウス AFX<sup>TM</sup> cDNA とする。) マウス 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。定法に従い ES 細胞へトランスフェクションを行い相同組み換えクローンを得た。得られた ES クローンを C57BL/6 マウス由来の胚盤法へ注入しキメラマウスを作成した。キメラマウスを C57BL/6 マウスと交配して

ヘテロマウスを作成した。

(2) 活性型 AFX 発現誘導細胞株の樹立  
活性型変異体遺伝子を薬剤耐性遺伝子 (Puromycin) を持つ発現ベクターに含まれる loxP/GFP/loxP 遺伝子の下流に挿入した、導入遺伝子を新たに構築した。この導入遺伝子を用いると、遺伝子の導入の有無が細胞が生きたままで確認できる利点がある。この導入遺伝子を、Myoblast C2C12 細胞に導入した。薬剤耐性コロニーをスクリーニング後、Cre Adeno virus を感染させて、FKHRL1 TM 及び AFX TM の蛋白の発現を確認した。

2. 早老症 AT の下流分子 Chk2 ノックアウトマウスの作成と解析

(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ッ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アウトマウスを作成した。また、高濃度

G418 選択により Chk2<sup>-/-</sup>ES 細胞を樹立した。

さらに、Chk2<sup>+/-</sup>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<sup>-/-</sup>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。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 膜に転写し、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。

C. 研究結果と考察

1. Daf-16 マウスホモログの機能解析

(1) Daf-16 のマウスホモログ FKHRL1 の gain-of-function および loss-of-function マウスの作成

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 FKHRL1 gain-of-function および loss-of-function マウスの作成を試みた。そこで、loxP / Neo / loxP – 活性型変異体 AFX および FKHRL1 cDNA からなる導入遺伝子を内在性の AFX および FKHRL1 遺伝子の転写開始点の下流にノックインしたトランスジェニックマウスを作製する。ホモ型トランスジェニックマウスは neo 遺伝子が存在するため、その下流の活性型 AFX 及び FKHRL1 遺伝子が発現せずノックアウトマウスとなる。一方、ヘテロ型トランスジェニックマウスを Cre 遺伝子のトランスジェニックマウスと交配することによって、誘導型トランスジェニックマウスとな

る。Cre 遺伝子をつないだプロモーターによって、この誘導型トランスジェニックマウスは組織特異的、経時特異的に変異型 AFX 或いは FKHRL1 が発現するので、様々な側面での AFX 及び FKHRL1 の機能を解析することが可能である。現在 FKHRL1 に関して、ヘテロマウスの作成に成功している。現在ヘテロ同士の交配を行いノックアウトマウスの作成を進めている。また、CAG-Cre トランスジェニックマウスと交配し、gain-of-function マウスの作成を進めている。

(2) 活性型 AFX 発現誘導細胞株の樹立  
AFX の下流遺伝子を検索するために、トランスジェニックマウス作製に用いた導入遺伝子を用いて細胞株の作製を行った。マウス筋芽細胞 C2C12 に上記遺伝子を導入して C2C12 mAFX 7-19 細胞株の樹立に成功した。まず、Adeno virus 感染後、時間を追って、活性型 AFX の発現を調べた。活性型 AFX は感染後 12 時間では、発現していないが、24 時間では発現していた。そして、感染後 24 時間以降は発現量の上昇は見られず、一定量が発現しているようであ



る。RNA の発現も 24 時間後以降で、発現が確認された。また、対照実験として、遺伝子の導入されていない Adeno Virus (control Adeno virus) を感染させても、活性型 AFX の発現は認められなかった。この細胞株を用いて活性型 AFX を発現誘導した際の細胞の表現型の変化を詳細に検討した。活性型 AFX を発現誘導すると細胞の増殖が著しく低下することが明らかになった。FACS を用いて細胞周期の解析を行ったところ、G0/G1 での細胞周期の停止が認められた。また、興味深いことに G2/M 期での細胞周期の停止も起こっていた (図 1)。細胞周期の制御に関わるタンパク質の発現の変化をウェスタンブロットにて検討した結果、cyclinE/Cdk2 の阻害分子である p27Kip1 の発現が著しく上昇していることが明らかになった (図 2)。これが、G0/G1 期での細胞周期の停止に寄与していると考えられる。G2/M 期での細胞周期の停止を解析する目的で、Chk1 および Histone H3 のリン酸化を検討したところ、両者とも著しく減少していた (図 2)。また、核を DAPI で染色して観察した結果、細胞分裂の後期

で停止していることがわかった。現在、このメカニズムについてさらに解析を進めているところである。一方 C2C12 は血清濃度を下げることにより、ミオシン重鎖を発現する筋細胞に分化する。活性型 AFX を発現誘導した細胞では、ミオシン重鎖の発現は全く起こらず、筋細胞への分化が著しく抑制された。現在、このメカニズムを詳細に解析しているところである。

また、AFX の下流分子を検索するために、この C2C12 mAFX 7-19 細胞を用いて、Cre Adeno virus 及び control Adeno virus 感染後 24 時間後、36 時間後、48 時間後の RNA を抽出し、DAN チップの解析をしている。

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

早老症候群に分類される遺伝性の疾患患者においては染色体不安定性が高いことが知られており、ゲノム不安定性と老化・老年病の関係が指摘されている。一方、正常の個体においても、紫外線・放射線、活性酸素などのストレスや DNA 複製・染色体

分配異常などゲノムの安定な維持を脅かす要因が存在することから、老年病・老化症状の発症にゲノムの維持機構が重要な役割を果たすと考えられている。

細胞周期チェックポイント機構は、細胞周期をコントロールして、細胞増殖を正常に進行させる。同時に、DNA 障害を検出して、修復が済むまで細胞周期の進行を停止し、修復できないような損傷の場合は、細胞自身を除去するためにアポトーシスを誘導する。DNA 障害を放置したまま細胞周期が進行すると、遺伝子変異や染色体欠損、染色体融合などを生じ老化・老年病の原因になりかねないと考えられている。

我々は昨年度、細胞周期チェックポイントに重要な働きを果たすと予想されていた、Chk1 欠損マウスの作成などをおして、Chk1 キナーゼの機能と Chk1 欠損による影響の解析を行ってきた。その結果、Chk1 キナーゼは DNA 複製の完了のモニタリングと M 期開始のタイミング決定に必須の役割を果たし、胚発生における細胞分裂の制御に必須であることを示してきた。また、ノックアウトマウスの表現形の類似性から

Chk1 が ATR の下流で機能することも示唆してきた。

一方、早老症の一つである末梢血管拡張性運動失調症 Ataxia Telangiectasia(AT) は、免疫不全、高発癌性など多彩な臨床症状を呈する遺伝病であり、細胞レベルにおいても放射線感受性、細胞周期チェックポイント、染色体の安定性に異常が見られる。これらの多彩な症状は、原因遺伝子 AT Mutated (ATM) の変異により生じることが明らかになっているが、AT の発症メカニズムは不明な点が多く、ATM 下流因子の解析が AT の多様な症状と老年病・老化現象の発症機構の理解に重要であると考えられる。本年度において我々は、ATM の下流分子として考えられている Chk2 の欠損マウスを作成し、*in vivo* における Chk2 キナーゼの役割について検討した。

Chk2 遺伝子ターゲティングは、翻訳開始部位を含む約 5kb のゲノムを neo 耐性遺伝子で置き換えることによって行った。この領域は、Chk2 キナーゼの翻訳開始部位、FHA ドメイン、キナーゼドメインの ATP 結合領域の一部をコードする 4 つのエクソン

を含むことから、ターゲッティングの結果、Chk2 タンパク質は発現しないか発現しても機能しないと考えられる。Chk2<sup>+/-</sup>マウスは見かけ上異常がなかったため、Chk2<sup>+/-</sup>同士との交配を行い、その産仔について検討した。Chk1<sup>-/-</sup>マウスとは異なり Chk2<sup>-/-</sup>マウスの子は予想された割合で生まれ、その後の成長においても Chk2<sup>+/-</sup>と目立った差は見られなかった。また、現在のところ、6ヶ月齢までにおいては ATM 変異マウスで見られるような早老症状・高発癌の表現型は観察されていない。

ATM 変異マウスにおいては、放射線感受性の増加が報告されている。Chk2 欠損マウスについて検討したところ、野生型マウスは放射線照射後7日から14日にかけて大半が死亡したのに対し、Chk2<sup>-/-</sup>マウスでは70%以上が2ヶ月以上生存した(図3)。この放射線抵抗性について組織レベルで検討したところ、Chk2<sup>-/-</sup>マウスの小脳細胞の一部、胸腺細胞(図4)および脾臓細胞は Chk2<sup>+/-</sup>マウスに比べ、放射線照射によるアポトーシスが低下していたことから、アポトーシスの低下が、生存率の上昇をもたら

したと考えた(図3)。一方、放射線が引き起こすこれらの組織のアポトーシスには、p53 が必須であることが知られている。そこで、放射線処理後、p53 タンパク質の細胞内含量の変化を検討したところ、Chk2<sup>-/-</sup>胸腺細胞では、p53 タンパク質の増加が Chk2<sup>+/-</sup>胸腺細胞に比べて幾分抑制されていた(図5A)。また、Chk2<sup>-/-</sup>ES 細胞においても放射線処理後の p53 の安定化は Chk2<sup>+/-</sup>に比べ幾分低下していたが、Chk2cDNA のトランスフェクションによって Chk2<sup>+/-</sup>と同程度まで回復した(図5B)。このことから、p53 タンパク質安定化の低下は Chk2 遺伝子欠損によるものと考えられた。また、ATM/ATR の阻害剤であるカフェイン処理により、放射線処理による Chk2<sup>-/-</sup>ES 細胞の p53 安定化はさらに低下したことから、Chk2<sup>-/-</sup>を介さない機構が p53 安定化の一部を担っていると考えられるが、この機構は ATM/ATR 依存であると考えられた(図5C)。

一方、p53 タンパク質の転写活性を検討したところ、放射線処理により野生型の胸腺細胞においては、p21、Noxa mRNA が6倍程度に増加していたのに対し、Chk2<sup>-/-</sup>胸腺

細胞においてはほとんど転写の上昇は見られなかった (図 6 A, B)。以上の成績は、DNA 傷害に応じた安定化に加え、Chk2 は p53 タンパク質の活性化に必要であると考えられた。

AT 患者由来の細胞は細胞周期チェックポイントに異常が見られる。Chk2<sup>-/-</sup>細胞における細胞周期チェックポイントについて Chk2<sup>-/-</sup>マウス胎児由来繊維芽細胞を用いて検討したところ、G1 チェックポイントの維持が Chk2<sup>-/-</sup>細胞で低下していることが明らかになった (図 7)。一方、G2 チェックポイントには異常は見られなかった。

本年度の Chk2 ノックアウトを用いた実験から、Chk2 が in vivo において、DNA 傷害による p53 タンパク質の安定化に機能していることが明らかとなった。また、Chk2<sup>-/-</sup>細胞における p21、Noxa の発現量の低下から、Chk2 は直接あるいは間接的に p53 の活性を調節していると考えられた。p53 の活性化には、p53 タンパク質のリン酸化とアセチル化が重要であると考えられており、今後の詳細な検討が必要である。一方、低線量の X-線処理では、Chk2<sup>-/-</sup>細胞に

おける p53 タンパク質の増加が野生型細胞に比べて顕著に低くなった。このことから、Chk2 は、わずかな DNA 傷害における細胞周期の停止やアポトーシスに p53 タンパク質の安定化と活性化に必須の役割を果たしていると考えられる。

p53 の変異が主な原因となっている家族性腫瘍の Li-furaumeni 症候群には、p53 が正常であるサブグループが存在することが知られていたが、最近、Li-furaumeni 症候群の患者由来の Chk2 遺伝子座に変異が存在することが報告された。これらの結果をふまえ、Chk2 の癌抑制遺伝子としての役割を検討するために、Chk2 欠損マウスの長期飼育を通して、Chk2 が発癌抑制に関与するか、老化・老年病の早期発症が見られるかについて現在検討中である。興味深いことに放射線照射 Chk2<sup>-/-</sup>マウスでは老化症状の一つである毛髪の色白化が起こってきている (図 3)。

#### 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 FKHL1 の loss-of-function (ノックアウト) マウスのヘテロマウスの作成に成功した。現在、ヘテロ同士の交配を行いノックアウトマウスの作成を行っている。また、CAG-Cre Tg マウスと交配して gain-of-function マウスの作成も進めている。また、活性型 AFX 発現誘導筋芽細胞 C2C12 株を樹立し、活性型 AFX を発現誘導すると細胞周期制御因子 p27kip1 の発現を誘導し、細胞周期を G0/G1 期で停止させることを見出した。また、G2/M 期でも細胞周期の停止が起こることが明らかになった。さらに、筋細胞への分化を抑制することが明らかになった。現在、この発現誘導株から RNA を抽出し、DNA チップ技術を用いて AFX のターゲット遺伝子を探索中である。

2. p53 は DNA 損傷、低酸素などのストレスによって誘導され、細胞周期の停止やアポトーシスに関与する遺伝子の発現調節を介して、癌化を抑制すると考えられている。細胞がストレスを受けない状態では、p53 は N 末端に結合した MDM2 によってユビキチン化されプロテアソーム系によって速やか

に分解されるために発現量は低く抑えられている。一方、放射線により DNA が障害を受けると、p53 タンパク質の安定化と活性化が生じるが、この過程の両方に Chk2 が関与していることが今回明らかになった。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Eriko Fujita, Koko Urase, Jun Egarashi, Yasuko Miho, Kyoko Isahara, Yasuo Uchiyama, Atushi Isoai, Hiroshi Kumagai, Keisuke Kuida, Noboru Motoyama, Takashi Momoi. Detection of caspase-9 activation in the cell death of the Bcl-x-deficient mouse embryo nervous system by cleavage sites-directed antisera. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **122**: 135-147, 2000.

2. Hiroyuki Takai, Kaoru Tominaga, Noboru Motoyama, Yohji A. Minamishima, Hiroyasu Nagahama, Tadasuke Tsukiyama, Kyoji Ikeda, Keiko Nakayama, Makoto Nakanishi, and Kei-ichi Nakayama. Aberrant Cell Cycle Checkpoint Function

- and Early Embryonic Death in *Chk1*<sup>-/-</sup> Mice. *Genes Dev.* **14**: 1439-1447, 2000.
3. Yuichiro Tojima, Atsushi Fujimoto, Mireille Delhase, Yi Chen, Shigetsugu Hatakeyama, Kei-ichi Nakayama, Yoko Kaneko, Yuji Nimura, Noboru Motoyama, Kyoji Ikeda, Michael Karin, Makoto Nakanishi. NAK is an I kappa B kinase-activating kinase. *Nature*, **404(6779)**: 778-782, 2000.
  4. Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Matsumoto, M., Nakamichi, I., Kitagawa, K., Shirane, M., Tsunematsu, R., Tsukiyama, T., Ishida, N., Kitagawa, M., Nakayama, K.-i., Hatakeyama, S.: Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27<sup>Kip1</sup>, polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J.*, **19**: 2069-2081. 2000.
  5. Takahashi, K., Nakayama, K.-i., Nakayama, K.: Mice lacking a CDK inhibitor, p57<sup>Kip2</sup>, exhibit skeletal abnormalities and growth retardation. *J. Biochem.*, **127**: 73-83. 2000.
  6. Kitagawa, K., Kawamoto, T., Kunugita, N., Tsukiyama, T., Okamoto, K., Yoshida, A., Nakayama, K., Nakayama, K.-i.: Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 associates with oxidation of methoxyacetaldehyde; in vitro analysis with liver subcellular fraction derived from human and Aldh2 gene targeting mouse. *FEBS Letters*, **476**: 306-311. 2000.
  7. Shimoda, K., Kato, K., Aoki, K., Matsuda, T., Miyamoto, A., Shibamori, M., Yamashita, M., Numata, A., Takase, K., Kobayashi, S., Shibata, S., Asano, Y., Gondo, H., Sekiguchi, K., Nakayama, K., Nakayama, T., Okamura, T., Okamura, S., Niho, Y., Nakayama, K.: Tyk2 plays a restricted role in

- IFN  $\alpha$  signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function. *Immunity*, 13: 561-571. 2000.
8. Tsukiyama, T., Ishida, N., Shirane, M., Minamishima, Y. A., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Nakayama, K., Nakayama, K.-i.: Down-regulation of p27<sup>Kip1</sup> expression is required for development and function of T cells. *J. Immunol.*, 166: 304-312. 2001.
9. Xie Z, Koyama T, Abe K, Fujii Y, Sawa H, Nagashima K: Upregulation of p53 protein in rat heart subjected to a transient occlusion of the coronary artery followed by reperfusion. *Jpn J Physiol* 50: 159-162, 2000
10. Okada Y, Sawa H\*, Tanaka S, Takada A, Suzuki S, Hasegawa H, Umemura T, Fujisawa J-i, Tanaka Y, Hall WW, Nagashima K: Transcriptional activation of JC virus (JCV) by human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax protein in human neuronal cell lines. *J Biol Chem*, 275: 17016-17023, 2000
11. Yamashita S, Mochizuki N, Ohba Y, Tobiume M, Okada Y, Sawa H, Nagashima K, Matsuda M: CalDAG-GEFIII activation of Ras, R-Ras, and Rap1. *J Biol Chem* 275: 25488-25493, 2000
12. Hiroi Y, Chen R, Sawa H, Hosoda T, Kudoh S, Kobayashi Y, Aburatani H, Nagashima K, Nagai R, Yazaki Y, Medof ME, Komuro I: Cloning of murine glycosyl phosphatidylinositol anchor attachment protein, GPAA1. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279: C205-C212, 2000
13. Shintaku M, Matsumoto R, Sawa H, Nagashima K: Infection with JC virus and possible dysplastic ganglion-like transformation of the cerebral cortical neurons in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59: 921-929, 2000
14. Sato-Matsumura KC, Matsumura T, Nakamura H, Sawa H, Nagashima K,

- Koizumi H: Membranous expression of annexin I is enhanced by calcium and TPA in cultured human keratinocytes. *Arch Dermatol Res*, 292: 496-499, 2000
15. 高井裕之、本山昇 (2001) チェックポイント制御の立役者 Chk1 と Chk2 細胞周期がわかる (羊土社) p118-123
2. 学会発表
1. Hiroyuki Takai, Miho Watanabe, Hiroshi Suzuki, Makoto Nakanishi, Kyoji Ikeda and Noboru Motoyama Role of Chk2 (Cds1) Checkpoint kinase in the Regulation of p53 after DNA Damage 16<sup>th</sup> Annual Meeting on oncogenes and Tumor Suppressors, June 22-25, 2000, California, USA
2. Hiroyuki Takai, Kaoru Tominaga, Miho Watanabe, Hiroshi Suzuki, Naoki Harada, Keiko Nakayama, Keiichi Nakayama, Makoto Nakanishi, Kyoji Ikeda, Noboru Motoyama *Chk1* and *Chk2* (*Cds1*) checkpoint genes in the cellular response to DNA damage. *Cancer & Molecular Genetics in the Twenty-first Century*, September 5-8, 2000, Michigan, USA
3. Hiroyuki Takai, Miho Watanabe, Naoki Harada, Yuki Okada, Hirofumi Sawa, Hiroshi Suzuki, Makoto Nakanishi, Kyoji Ikeda, Noboru Motoyama Chk2/Cds1 Checkpoint Kinase in Radiation-induced Apoptosis and p53 Regulation. *Keystone Symposia, Cell Cycle 2001*, January 9-14, 2001, New Mexico, USA
4. Kazuhito Naka, Akira Matsuura, Akira Tachibana, Fuyuki Ishikawa, Kyoji Ikeda, Noboru Motoyama, Introduction of telomerase to ataxia teleangiectasia cells can extend shortened telomeres and bypass replicative senescence. *Miami Winter Symposia, Cell Death and Aging*, February 3-7, 2001, Miami Beach, Florida, USA.



5. Kazuhito Naka, Akira Tachibana, Fuyuki Ishikawa, Kyoji Ikeda, Noboru Motoyama, Introduction of telomerase to ataxia telangiectasia cells can extend shortened telomeres and bypass replicative senescence. Cold Spring Harbor Symposium, Telomeres and Telomerase, March 28-April 1, 2001, Cold Spring Harbor, NY, USA.
6. Kazuhito Naka, Akira Matsuura, Akira Tachibana, Fuyuki Ishikawa, Kyoji Ikeda, Noboru Motoyama, Establishment of immortalized Ataxia Telangiectasia Cells by Telomerase. The International Workshop on Dynamics and Algorithms of Chromosome Function. November 20-21, 2000, Hiroshima, Japan.
7. 高井裕之、渡部美穂、原田直樹、岡田由紀、澤 洋文、鈴木宏志、中西 真、池田恭治、本山 昇 放射線誘導アポトーシスと p53 の機能制御における Cds1/Chk2 の役割 第 23 回日本分子生物学会年会 2000 年 12 月 13-16 日 神戸
8. 小林洋介、渡部美穂、高井裕之、岡田由紀、澤 洋文、鈴木宏志、中西 真、池田恭治、本山 昇 DNA polymerase  $\beta$ 2 欠損マウスは出生後の発育遅延及び水頭症を呈する 第 23 回日本分子生物学会年会 2000 年 12 月 13-16 日 神戸
9. 仲 一仁、立花 章、石川冬木、池田恭治、本山 昇、テロメラーゼによる末梢血管拡張性運動失調症 (Ataxia Telangiectasia) 患者由来不死化細胞の樹立、第 23 回日本分子生物学会年会 平成 12 年 12 月 13-16 日、神戸市
10. 吉田聖美、岡田由紀、澤 洋文、池田恭治、本山昇 daf-16 の哺乳類ホモログ AFX、FKHR、FKHRL1 の機能解析 第 23 回日本分子生物学会年会 2000 年 12 月 13-16 日 神戸
11. 中山 啓子、畠山 鎮次、永濱 裕康、南嶋 洋司、松本 雅記、中道 郁夫、北川 恭子、白根 道子、恒松 良祐、石田 典子、北川 雅敏、中山 敬一 染色体倍数性及び中心体複製に異

常をきたすノックアウトマウスの解析	以上特許出願中
第 59 回 日本癌学会総会 ワークシ ヨップ 2000 年 9 月 横浜	2. 実用新案登録
12. Keiko Nakayama, Hiroyasu Nagahama, Masatoshi Kitagawa, & Kei-ichi Nakayama. Generation and characterization of Skp2 <sup>-/-</sup> p27 <sup>-/-</sup> doubly knockout mice. Keystone Symposium Cell Cycle 2001, January 9-14, 2001, New Mexico, USA	なし 3. その他 なし

#### F. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

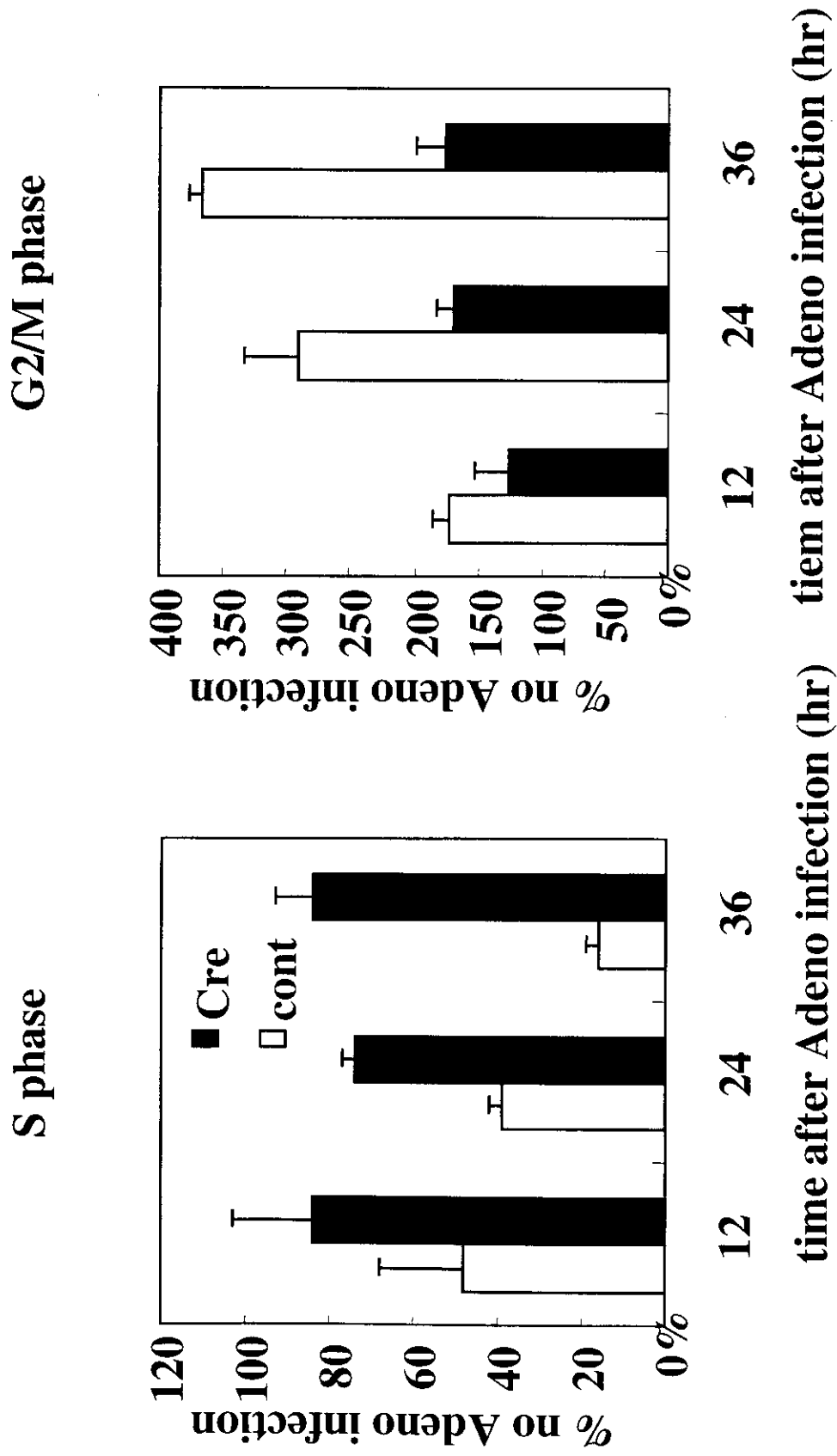
Cds1 遺伝子がノックアウトされた細胞およびマウス、並びにそれらの利用

(発明者：池田恭治、本山 昇、高井裕之、渡部美穂)

Polβ2 遺伝子欠損動物

(発明者：池田恭治、本山 昇、高井裕之、小林洋介、渡部美穂)

(图1)



(图2)

