

90 kDa 熱ショック蛋白質の細胞増殖における役割

井上 篤 志

札幌医科大学整形外科科学講座 (主任 石井清一 教授)

佐藤 昇 志

札幌医科大学病理学第1講座 (主任 菊地浩吉 教授)

Cell Growth Regulation by the Interaction between Hsp 90 and Cdc 2 Kinase

Atsushi INOUE

*Department of Orthopaedic Surgery, Sapporo Medical University School of Medicine
(Chief : Prof. S. ISHII)*

Noriyuki SATO

*Department of Pathology (Section 1), Sapporo Medical University School of Medicine
(Chief : Prof. K. KIKUCHI)*

ABSTRACT Cell growth is regulated by various sets of intranuclear proteins. The oncosuppressor proteins, pRb and p 53 are the most important of the molecules that inhibit the cell cycle. It has been reported that hsc 73, one of the members of the 70 kDa heat shock protein family, was associated with pRb and p 53. It was suggested that hsp may be important in the cell growth control mechanism.

In this paper, we reported that hsp 90 could interact with cdc 2, which is the major cyclin dependent kinase, in the G2/M phase, although hsp 90 could not interact with pRb. Moreover, a human osteosarcoma cell line, HOS, that was transfected with hsp 90-cDNA showed growth inhibition, when observed with ³H-thymidine incorporation. These data indicated that hsp 90 might influence cell growth regulation by interacting with cdc2 kinase. (Received January 6, 1995 and accepted January 26, 1995)

Key words: Hsp 90, Cdc 2 kinase, Protein interaction

1 緒 言

熱ショック蛋白質 (heat shock protein, hsp, ストレス蛋白質) は細胞内において基質となる様々な蛋白質やペプチドと会合することにより、それらの安定化、輸送、分解、高次構造形成に関わっていることが知られている。一方ここ数年、hspが細胞の癌化機構に重要な働きをしていることも示唆されている。例えば70 kDa hspファミリーの一つであるhsc 73がmutant p 53と会合することにより¹⁾⁻²⁾、細胞の癌化を抑制することが報告されている³⁾。また我々はhsc 73が癌抑制遺伝子産物pRbと会合することを既に報告⁴⁾し、その機能的意義を解明しつつある。また90 kDa hsp (以下hsp 90) はこれまでステロイドホルモンレセプターや、チロシ

ンキナーゼの代表であるpp 60^{v-src}, cacein kinaseII, actin, tubulinなどとの会合が知られており⁵⁾⁻⁸⁾、これらの機能を調節する因子である可能性が推測されている。このようにhspが癌抑制遺伝子産物やシグナル伝達に関与する因子を効率的に認識するという事実と、hsp自身が細胞増殖抑制作用を有するという可能性から、我々はhspと細胞周期関連因子との関わりを検索している。

最近細胞周期はG1→S→G2→M→G1の各特定時期におけるサイクリンとサイクリン依存性キナーゼ(cyclin dependent kinase 以下cdk)との複合体により制御されること解ってきた。G1/S境界期ではサイクリンD/cdk 2, 4, 6⁹⁾⁻¹⁰⁾及びサイクリンE/cdk 2¹¹⁾が、S期ではサイクリンA/cdk 2¹²⁾、G2/M期ではサイクリンB/

cdc 2¹³⁾ が pRb や p 107 をリン酸化することにより細胞増殖の方向へと導いている。さらにサイクリン/cdk 複合体のリン酸化活性を抑制する因子として、p 21/Cip1/Waf1/Cap 20/Sdi1¹⁴⁾⁻¹⁷⁾, p 16/Ink 4¹⁸⁾, p 27/Kip1¹⁹⁾⁻²¹⁾, p 28/Ick²²⁾ 等も発見されており、細胞周期制御のメカニズムが解明されつつある。

我々は hsp 90 が pRb を基質としたときの cdc 2 のリン酸化活性を抑制するという事実 (投稿準備中) から、細胞内における hsp 90 と pRb 及び cdc 2 との分子会合を解析した。その結果、hsp 90 は cdc 2 と会合したが、pRb との会合は認められなかった。さらに、hsp 90-cDNA を骨肉腫細胞 HOS へ遺伝子導入することにより、hsp 90 が細胞増殖抑制作用を有する可能性が示唆された。以上の実験による事実をもとに、hsp の細胞周期関連因子に対する分子認識とその機能的意義について考察する。

2 実験方法

2.1 細胞培養及び溶解

ヒト骨肉腫細胞株 HOS を 6% FCS-RPMI 1640 で 37°C, CO₂ 5.0% の条件下にて培養した。5.0×10⁷ の細胞をラバーポリスマンで得、1 ml の Lysis buffer [0.05 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.5% CHAPS, 0.14 M NaCl, 1 mM PMSF, 1 µg/ml pepstatin, 0.05% sodium azide, 0.2 TIU/ml aprotinin, 5 mM EDTA] で 4°C, 30 分間処理した後、12,000 rpm にて 10 分間遠心した。

2.2 精製蛋白質の会合反応

0.05 nM のバキュロウイルスより精製した pRb 蛋白質 (国立癌センター研究所, 田矢洋一博士より供与) と 0.05 nM の精製 hsp 70 及び hsp 90 (いずれも Stress-Gen Biotechnologies Corp., Victoria, B. C., Canada) をそれぞれ 20 µl の complex buffer [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 3 mM DTT] の存在下で室温のもと 1 時間反応させた。

2.3 免疫沈降

Affigel 10 beads (Bio-Rad, Richmond, CA) を 4°C に冷却したイソプロパノールで処理した後、ヤギ抗マウスポリクローナル抗体 IgG (KPL, Gaithersburg, MD) と 4°C で 10-12 時間反応させた。0.1 M エタノールアミンで不活化した後、0.1 M Tris-HCl, 0.2 M NaCl (pH 8.3) で 4 回洗浄した。上記の方法で作製した 150 µl の Affigel 10 beads に抗 Rb モノクローナル抗体 IgG, Mh-Rb-02 p (Pharmingen, San Diego, CA), 抗 hsp 90 モノクローナル抗体 IgG, AC88

(Affinity BioReagents, Nashanic Station, NJ), 抗 cdc 2 モノクローナル抗体 IgG, Bcdc 2.1 (Boehringer Mannheim Biochemica) をそれぞれ室温にて 2 時間反応させた。これに細胞溶解液及び会合反応させた精製蛋白質を加え、4°C で 12-18 時間緩やかに混和した。非特異的に結合した蛋白質を除去するため、washing buffer [0.1% CHAPS, 0.2 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl (pH 8.0)] で 5 回洗浄した後、75 µM の SDS-sample buffer [final, 3% SDS, 5 M DTT, 10% glycerol, 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)] を加え、100°C で 5 分間煮沸した。

2.4 Western blot

作製したサンプルを 8% あるいは 10% の SDS-PAGE で泳動した後、メタノール処理した Immobilon membrane (Millipore, Bedford, MA) へ転写した。室温にて 2 時間 10% スキムミルクで処理した後、適当倍希釈した一次抗体、Mh-Rb-02 p, Bcdc 2.1, 3a3 抗 hsp 70 モノクローナル抗体 (Affinity BioReagents, Nashanic Station, NJ), 3B6 抗 hsp 90 モノクローナル抗体 (Affinity BioReagents, Nashanic Station, NJ) を 90 分間反応させた。0.1% Tween 20-PBS で 2 回洗浄した後、さらに 1000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体を 30 分間反応させた。ECL detection reagent (RPN 2105, Amersham, US) を反応させ、X-ray フィルムを用いて現像した。

2.5 遺伝子導入及び ³H-thymidine による解析

6 穴プレートで培養したヒト骨肉腫細胞 HOS に hsp 90-cDNA を高発現ベクターに組み込んだ pEFα-hHSP 90 及び pSRα-hHSP 90 (いずれも慶応大学医学部病理学教室, 山田健人博士より供与) を LIPOFECTIN Reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD) の存在下で遺伝子導入した。遺伝子導入した細胞は 96 穴プレートに移し、1 µCi ³H-thymidine (NEN) を加えた後、6 時間反応させた。プレートを -20°C で凍結させ、ハーベスターで回収した後、β線カウンターで計測した。

3 結果

3.1 in vivo における hsp 90 と pRb との分子会合の検討

hsp 90 が細胞内において pRb と分子会合するか否かを免疫沈降法を用いて検討した。Affigel 10 beads に付着した抗 Rb モノクローナル抗体 (mAb) で骨肉腫細胞 HOS の細胞溶解液を免疫沈降し、8% SDS-PAGE で泳動した後、Western blot により解析した。その結

果, 抗 hsp 70 mAb で 70 kDa 付近にバンドが検出されたが (Fig. 1 Lane 4), 抗 hsp 90 mAb では 90 kDa 付近にバンドが検出されなかった (Lane 7). このことから, 細胞内において hsp 70 は pRb と分子会合を示すが, hsp 90 は pRb とは分子会合を示さないことが示唆された. Lane 1, 4, 7 で認められる約 55 kDa のバンドは免疫沈降に用いた抗 Rb mAb の heavy chain である.

3・2 in vitro における hsp 90 と pRb との分子会合の検討

上記の in vivo における結果を in vitro の無細胞系で精製蛋白質を用いて確認した. complex buffer の存在下において同一モル比で加えられた pRb と hsp 70 及び pRb と hsp 90 を反応させ, Affigel10 beads に付着した抗 Rb mAb で免疫沈降した. その結果, 抗 hsp 70 mAb では 70 kDa 付近にバンドが検出されたが (Fig. 2 Lane 3), 抗 hsp 90 mAb では 90 kDa 付近にバンドが検出されなかった (Lane 4). このことから無細胞系においても hsp 90 の pRb に対する会合親和性は hsp 70 に比べて明かに弱く, hsp 90 が pRb に会合しない可能性が示唆された.

3・3 in vivo における hsp 90 と cdc 2 との会合の解析

サイクリン依存性キナーゼの一つである cdc 2 と hsp 90 との in vivo での分子会合の有無を検索するため, HOS 細胞溶解液と Affigel 10 beads に付着した抗 hsp 90 mAb とを免疫沈降し, 10% SDS-PAGE で泳動した

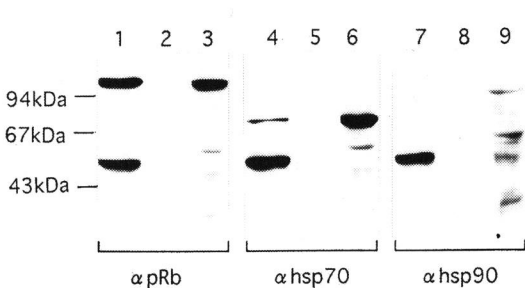


Fig. 1 pRb interacts with hsp 70, not with hsp 90, determined by immunoprecipitation using of anti-pRb mAb Mh-Rb-02p and the HOS cell lysate. The immunoprecipitates made with (Lane 1, 4 and 7) or without (Lane 2, 5 and 8) anti-pRb mAb Mh-Rb-02p and the HOS cell lysate were run on 8% SDS-PAGE, Western blotted and reacted with anti-pRb mAb Mh-Rb-02p (Lane 1, 2 and 3), anti-hsp 70 mAb 3a3 (Lane 4, 5 and 6) and anti-hsp 90 mAb 3B6 (Lane 7, 8 and 9). Lane 3, 6 and 9 are the positive controls for each mAb; namely, the mixture of 10 ml of the HOS cell lysate and 5 ml of SDS sample buffer was run on SDS-PAGE, Western blotted, and reacted with each mAb.

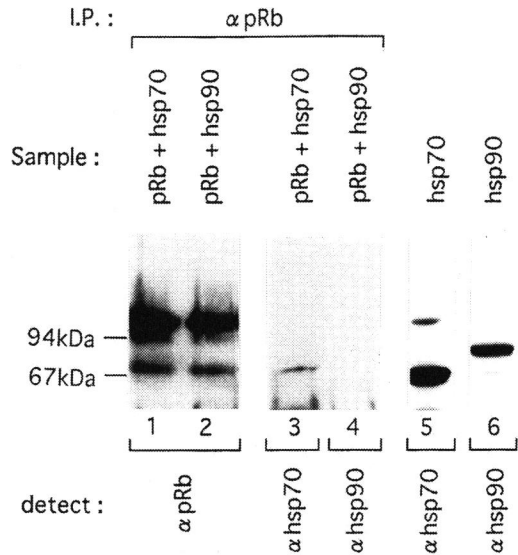


Fig. 2 pRb interacts with hsp 70, not with hsp 90, determined by immunoprecipitation using of anti-pRb mAb Mh-Rb-02p and purified proteins, such as pRb, hsp 70 and hsp 90. The immunoprecipitates made with pRb, hsp 70 and anti-pRb mAb (Lane 1 and 3) were run on 8% SDS-PAGE, Western-blotted and reacted with anti-pRb mAb (Lane 1) and anti-hsp 70 mAb 3a3 (Lane 3). The immunoprecipitates made with pRb, hsp 90 and anti-pRb mAb (Lane 2 and 4) were reacted with anti-pRb mAb (Lane 2) and anti-hsp 90 mAb 3B6 (Lane 4). Lane 5 and 6 are the positive controls for anti-hsp 70 mAb 3a3 and anti-hsp 90 mAb 3B6, respectively; namely, 0.05 nM hsp 70 and hsp 90 were run on SDS-PAGE, Western blotted and reacted each mAb.

後, Western blot により解析した. その結果, 抗 hsp 90 mAb で 90 kDa 付近にバンドが検出される (Fig. 3 Lane 1) と同時に抗 cdc 2 mAb で 34 kDa にバンドが検出された (Fig. 3 Lane 4). さらに同じ HOS 細胞溶解液を用いて抗 cdc 2 mAb で免疫沈降し, 抗 hsp 90 mAb との反応性を解析した. その結果, 抗 cdc 2 mAb で 34 kDa にバンドが検出される (Fig. 4 Lane 1) と同時に抗 hsp 90 mAb で 90 kDa 付近にバンドが検出された. このことは細胞内において cdc 2 と hsp 90 が分子会合することを示唆した.

3・4 hsp 90-cDNA の遺伝子導入による解析

ここまで hsp 90 が細胞内において cdc 2 を選択的に認識する可能性を示唆してきた. ここでは hsp 90 と cdc 2 の会合の細胞生物学的意義を解析するため, hsp 90-cDNA を骨肉腫細胞 HOS に遺伝子導入することにより, その細胞の増殖を ^3H -thymidine の取り

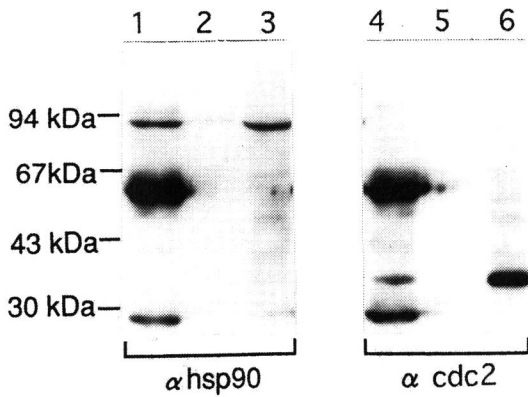


Fig. 3 Detection of immunoprecipitates made with anti-hsp 90 mAb AC88 and the HOS cell lysate by anti-cdc 2 mAb Bcdc 2.1. The immunoprecipitates made with (Lane 1 and 4) or without (Lane 2 and 5) anti-hsp90 mAb AC88 and the HOS cell lysate were run on 10% SDS-PAGE, Western blotted and reacted with anti-hsp 90 mAb 3B6 (Lane 1, 2 and 3) and anti-cdc 2 mAb Bcdc 2.1 (Lane 4, 5 and 6). Lane 3 and 6 are the positive controls for mAbs against the HOS cell lysate as illustrated in Fig. 1.

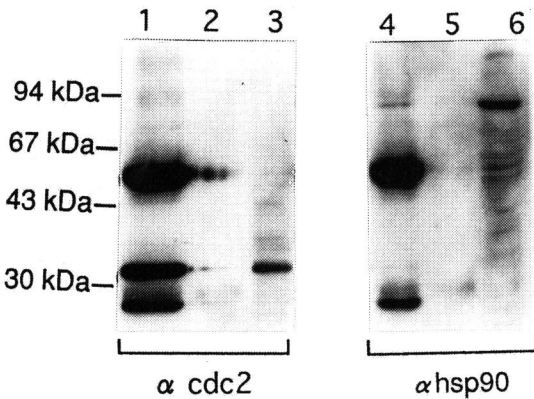


Fig. 4 Detection of immunoprecipitates made with anti-cdc 2 mAb Bcdc 2.1 and the HOS cell lysate by anti-hsp 90 mAb 3B6. The immunoprecipitates made with (Lane 1 and 4) or without (Lane 2 and 5) anti-cdc 2 mAb Bcdc 2.1 and the HOS cell lysate were run on 10% SDS-PAGE, Western blotted and reacted with anti-cdc 2 mAb Bcdc 2.1 (Lane 1, 2 and 3) and anti-hsp 90 mAb 3B6 (Lane 4, 5 and 6). Lane 3 and 6 are the positive controls for mAbs.

込みにより評価した。高発現ベクター- $EF\alpha$ 及び $SR\alpha$ に hsp 90-cDNA を組み込んだプラスミドと $EF\alpha$ 及び $SR\alpha$ のプロモーターのみのプラスミドをそれぞれ Lipofec-tion 法を用いて導入し、 3H -thymidine の取り込みを

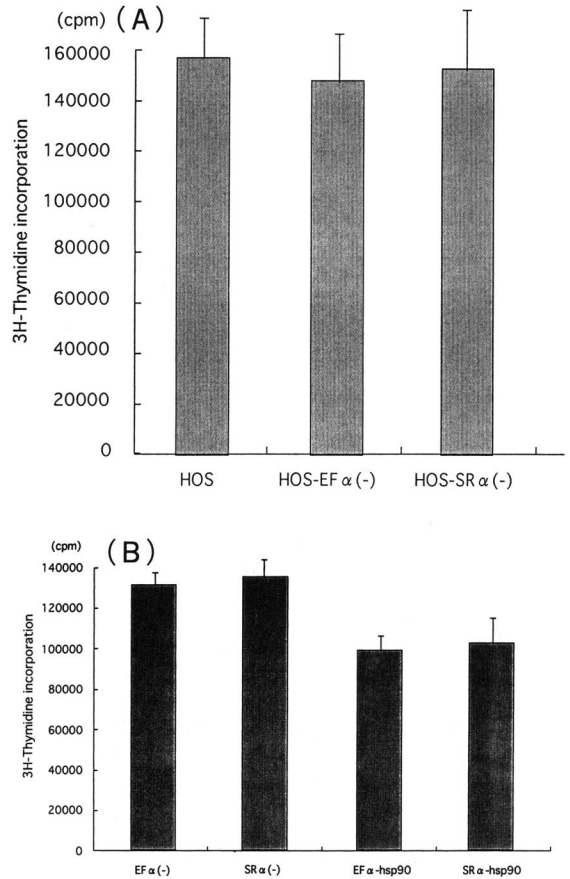


Fig. 5 Analysis of 3H -thymidine incorporation of the transient over-expression system of hsp 90 in a human osteosarcoma cell line, HOS. (A) HOS is a sample which was not treated by Lipofec-tion method. HOS- $EF\alpha(-)$ and HOS- $SR\alpha(-)$ are samples treated by Lipofec-tion method with the expression vector of $EF\alpha$ and $SR\alpha$, respectively. (B) $EF\alpha(-)$ and $SR\alpha(-)$ were used with the expression vector of $EF\alpha$ and $SR\alpha$ promoter without hsp 90-cDNA, respectively. $EF\alpha$ -hsp 90 and $SR\alpha$ -hsp 90 were used with the expression vector of $EF\alpha$ and $SR\alpha$ promoter including hsp 90-cDNA, respectively.

カウントした。まず Lipofec-tion 法による細胞の増殖に与える影響を確認した。その結果、遺伝子導入を行った細胞と行わない細胞において 3H -thymidine の取り込みに有意差を認めなかった (Fig. 5-A)。次に hsp 90-cDNA の細胞に与える影響を検索したところ、hsp 90-cDNA を取り込んだ細胞は $EF\alpha$ 、 $SR\alpha$ いずれのベクターを用いても 3H -thymidine の取り込みが危険率 1% 以下の有意差で低下していた (Fig. 5-B)。

4 考 察

hsp は種間で高い分子相同性を示し、進化の過程でよく保存された蛋白質の一つである。このことは細胞内における hsp の機能の重要性を示唆していると言える。これまで hsp は変性蛋白質の輸送、分解、前駆体蛋白質の膜透過性保持など非特異的因子に会合する分子シャペロンとして注目されてきた²³⁾⁻²⁵⁾。しかし一方で hsp がこれらシャペロン機能としてばかりではなく、基質となる蛋白質の選択的認識、およびその機能の安定化、あるいは機能の助長に関与するという報告がなされつつある。すなわち、細胞質及び核に存在する 70 kDa hsp ファミリーの一つである hsc 73 が mutant p 53 と分子会合し細胞の癌化を抑制する事実³⁾や、hsc 73 が pRb のポケット領域より N 末のアミノ酸 301-372 の領域に会合するという事実 (投稿中) は、hsc 73 が選択的に基質を認識する可能性を示唆している。さらに hsc 73 と同様に細胞質や核に存在する hsp 90 はステロイドホルモンレセプターや⁶⁾ チロシンキナーゼの一つである pp 60^{v-src} 等と会合すること⁶⁾ が知られている。今回我々は hsp 90 が pRb を基質とした cdc 2 のリン酸化活性を抑制した結果に基づき (投稿準備中)、hsp 90 と pRb 及び cdc 2 との分子会合の有無を検索した。これまで hsp 90 が細胞周期関連因子と会合するという報告はなく、分子会合の存在が確認されれば、hsc 73 に続き hsp 90 も細胞周期に関与する可能性が強く考えられる。

今回の実験から我々は、細胞内において hsp 90 が cdc 2 と分子会合するという新知見を得た。cdc 2 は G 2/M 期で pRb や p 107 をリン酸化することにより、細胞増殖を促す方向に働く因子として知られている²⁶⁾。hsp 90 が cdc 2 と会合する事実は、hsp 90 が細胞周期を調節する因子の一つである可能性を推測させる。hsp 90 が細胞周期依存性に増減するという報告²⁷⁾はこの可能性を裏付ける。我々が先に行った実験より得た hsp 90 が cdc 2 のリン酸化活性を抑制するという結果 (投稿準備中) は、hsp 90 が単なる分子シャペロンとして cdc 2 と会合するのではなく、機能的意義を有して会合することを意味している。しかし、ここでまだ解析すべき問題が残る。今回は細胞溶解液を用いた実験であったため、hsp 90 と cdc 2 との会合が直接的であるか、あるいは他の因子を介した間接的会合であるかを今後決定する必要がある。熱ショックにより核への局在が高まる hsp 90 と核に局在する cdc 2 との直接会合の可能性は、充分高いと推測される。さらに、hsp 90 自身に cdc 2 のリン酸化活性を抑制する機能があるのか、あ

るいは hsp 90 がサイクリン依存性キナーゼ抑制因子等他の因子を介して機能しているかの解明が、今後に残る大きな課題である。

hsp 90 が細胞周期の調節に関わる可能性は、我々の遺伝子導入による実験結果からも示唆された。hsp 90 は癌細胞において構造的に発現している蛋白質である。今回は骨肉腫細胞 HOS に hsp 90-cDNA を遺伝子導入することにより、細胞内の hsp 90 を増量することが細胞にいかなる影響を及ぼすかをみた実験である。hsp 90 の高発現は骨肉腫細胞 HOS における ³H-thymidine の取り込みを有意に低下させた。このことは hsp 90 が細胞増殖を抑制する方向へ働いたことを意味する。つまり、hsp 90 が cdc 2 と会合する機会が増すことにより、cdc 2 の機能抑制が高まった結果、非リン酸化型の pRb や p 107 等の癌抑制遺伝子産物が多くなり、細胞増殖が抑制されたと推測される。hsp 90-cDNA の遺伝子導入後の ³H-thymidine の取り込みは、Jurkat 細胞など T 細胞リンパ腫を用いても骨肉腫細胞 HOS と同様に低下していた。今後は stable transformant をとり解析を進める必要がある。

最近、癌に対する温熱療法の有効性が認められつつある。我々が今回示した hsp の細胞内における選択的分子認識が、温熱療法の効果の理論的根拠となっている可能性も考えられる。今後これら hsp の機能解析を通して癌化のメカニズムを解明し、hsp を利用した癌細胞増殖制御が可能か否かの検討が必要と思われる。

5 結 語

hsp 90 と pRb 及び cdc 2 との分子会合の有無を in vivo 及び in vitro で解析した。さらに hsp 90 の細胞内における高発現の意義を解析した。その結果、

- 1) hsp 90 は in vivo 及び in vitro のいずれにおいても pRb との会合は確認されなかった。
- 2) hsp 90 は in vivo において cdc 2 と分子会合することが確認された。
- 3) hsp 90-cDNA の遺伝子導入により hsp 90 が高発現した骨肉腫細胞 HOS は ³H-thymidine の取り込みが減少していた。このことは hsp 90 が細胞増殖を抑制する可能性を示唆した。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導と御校閲を頂いた本学病理学第 1 講座 菊地浩吉教授ならびに貴重な研究の機会を与えて頂いた本学整形外科学講座 石井清一教授に深謝致します。また、本研究に御協力頂いた国立が

んセンター研究所 田矢洋一博士ならびに慶応大学医学部病理学教室 山田健人博士に深謝致します。

文 献

- Hinds PW, Finlay CA, Frey AB, Levine AJ. Immunological evidence for the association of p53 with a heat shock protein, hsc70, in p53-plus-ras-transformed cell lines. *Mol Cell Biol* 1987, 7: 2863-2869.
- Hainaut P, Milner J. Interaction of heat shock protein 70 with p53 translated in vitro. *EMBO J* 1992, 11: 3513-3520.
- Yehiely F, Oren M. The gene for the rat heat-shock cognate, hsc 70, can suppress oncogene-mediated transformation. *Cell Growth Differ* 1992, 3: 803-809.
- Nihei T, Takahashi S, Sagae S, Sato N, Kikuchi K. Protein interaction of Retinoblastoma gene product pRb1 10 with Mr 73,000 heat shock cognate protein. *Cancer Res* 1993, 53: 1-4.
- Baulieu EE. Contragestation and other clinical applications of RU 486, an antiprogestosterone at the receptor. *Science* 1989, 245: 1351-1357.
- Xu Y, Lindquist S. Heat-shock protein hsp 90 governs the activity of pp60v-src kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 7074-7078.
- Miyata Y, Yahara I. The 90-kDa heat shock protein, hsp 90, binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity. *J Biol Chem* 1992, 267: 7042-7047.
- Collier NC, Schlesinger MJ. The dynamic state of heat shock proteins in chicken embryo fibroblasts. *J Cell Biol* 1986, 103: 1495-1507.
- Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 1993, 73: 487-497.
- Dowdy SF, Hinds PW, Louie K, Reed SI, Arnold A, Weinberg RA. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 1993, 73: 499-511.
- Tsai L-H, Lees E, Faha B, Harlow E, Riabowol K. The cdk 2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells. *Oncogene* 1993, 8: 1593-1602.
- Elledge SJ, Richman R, Hall FL, Williams RT, Lodgson N, Harper JW. CDK 2 encodes a 33-kDa cyclin A-associated protein kinase and is expressed before CDC 2 in the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 2907-2911.
- Labbe J-C, Capony J-P, Caput D, Cavadore J-C, Derancourt J, Kaghad M, Lelias J-M, Picard A, Doree M. MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *EMBO J* 1989, 8: 3053-3058.
- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993, 366: 701-704.
- Gu Y, Turck CW, Morgan DO. Inhibition of CDK 2 activity in vivo by an associated 20 K regulatory subunit. *Nature* 1993, 366: 707-710.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 cdk-interacting protein Cip 1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993, 75: 805-816.
- El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppressio. *Cell* 1993, 75: 817-825.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993, 366: 704-707.
- Polyak K, Kato J, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. p27Kip1, a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor-b and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994, 8: 9-22.
- Polyak K, Lee M-H, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994, 78: 59-66.
- Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994, 78: 67-74.
- Hengst L, Dulic V, Slingerland JM, Lees E, Reed SI. A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 5291-5295.
- Beckmann RP, Mizzen LA, Welch WJ. Interaction of hsp 70 with newly synthesized proteins; implications for protein folding and assembly. *Science* 1990, 248: 850-854.
- Hendrick JP, Hartl F-U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem* 1993, 62: 349-384.

25. Deshaies RJ, Koch BD, Schekman R. The role of stress proteins in membrane biogenesis. *Trends Biochem Sci* 1988, 13: 384-388.
26. Lin BT-Y, Gruenwald S, Morla AO, Lee WH, Wang JYJ. Retinoblastoma cancer suppressor gene product is a substrate of the cell cycle regulator cdc 2 kinase. *EMBO J* 1991, 10: 857-864.
27. Jerome V, Vourc'h C, Baulieu E-E, Catelli M-G. Cell cycle regulation of the chicken hsp90a expression. *Exp cell Res* 1993, 205: 44-51.

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部整形外科学講座 井上篤志