

「生命活動のプログラム」

平成7年度採択研究代表者

鍋島 陽一

(京都大学大学院医学研究科 教授)

「個体老化の分子機構の解明」

1. 研究実施の概要

老化に伴う疾患を克服することは人類の有史以来の願望であり、多くの試みが積み重ねられてきたが、その複雑さから研究は多くの困難を抱えていた。しかし、遺伝子研究の進展によってその突破口が開かれようとしている。

我々の研究室では挿入突然変異によって早期老化症状を呈する Klotho マウスを樹立した。多彩な老化症状は単一遺伝子の欠損に起因しており、原因遺伝子 Klotho を同定した。Klotho 遺伝子は新規の1型膜蛋白質をコードしており、その発現は腎臓で高く、弱い発現が中枢神経系で観察された。骨、皮膚、胃などの強い変異症状が観察される臓器で、Klotho 遺伝子の発現が観察されず、Klotho 蛋白質の機能を伝える液性因子の存在が示唆された。また、ヒト相同遺伝子を分離し、その構造を決定したところ、マウス Klotho に相同の1型膜蛋白質をコードする mRNA と分泌型蛋白質をコードする mRNA が同定された。Klotho 蛋白質がターゲット組織、分子に結合し、機能していることが推定されるが、Klotho が b-Glucosidase に相同性が高いことから、酵素活性によって不活性分子の活性化に関わる可能性も残されており、その他の可能性を含めて、検討中である。

Klotho マウスは単一遺伝子の機能欠損により多彩な老化症状を示しており、その症状の解析と原因遺伝子 Klotho の機能解析により、我々がどのようにして健康な状態を維持しているかが明らかにされるとともに、各種の老化疾患の発症機構の理解が進むものと期待される。

2. 研究実施内容

挿入突然変異によって早期老化症状を呈するトランスジェニックマウス系統を樹立した。次いで、原因遺伝子として、b-Glucosidase に相同性をもつ1型膜蛋白質を同定し、Klotho と名付けた。Klotho 遺伝子は腎臓で主に発現しており、他に中枢神経系での発現が観察された。しかし、変異表現型は全身の多様な臓器で観察され、液性因子の介在を推定させるものであった。

続いて、変異マウスの解析を基礎として次の3つの方向の研究を展開した。第1

は Klotho 蛋白の機能を解析し、関連分子を探索することであり、第2の課題は変異表現型の解析により、様々な老化症状の成り立ちを解析し、第3は得られた成果をヒト疾患の病態解明と診断、治療法の開発に結びつけることである。以下にその結果を概説する。

I. Klotho 蛋白の機能解析

1) Klotho 蛋白の存在様式の解析

抗体による解析の結果、Klotho 蛋白は腎臓の遠位尿細管の baso-lateral site に存在すること、腎臓には約 130 kd の全長型蛋白と、C 端側を認識する抗体のみに反応する 60 kd の蛋白が同定された。後者は truncated form である可能性が高く、切断配列として KKRK 配列が推定される。N 末端側がプロセスされ、血中に移行する可能性が示唆されたことから、血清、あるいはターゲット組織の検討を勢力的に行ったが、現時点では明瞭になっていない。

細胞膜サンプルの抗体を用いた免疫沈降により、Klotho 蛋白に結合している分子が存在が推定されており、その精製、構造解析、遺伝子クローニングを計画している。

2) Klotho 蛋白の機能ドメインの解析

全長型を発現するトランスジェニックマウス、アデノウイルスベクターはいずれも、変異表現型を改善すること、また、腎臓で発現しなくても機能できることを示唆した。その後、N 末端側をもつ分泌型を発現するアデノウイルスベクターを調整し、機能回復実験を行っているが、少なくとも寿命の延長、体重の増加などのマクロな変異表現型の回復が確認され、さらに組織学的な解析により、分泌型も一定の機能を保持している可能性が高いことを示す結果を得ている。

3) 原因遺伝子の発現制御機構の解析

Klotho 遺伝子上流を含む転写制御解析遺伝子を構築し、トランスジェニックマウスを作成し、発現を検討している。一方、培養細胞系による解析を進めるために、各種の培養細胞における Klotho 遺伝子の発現を解析したが、発現を保持している培養細胞株を確認できなかった。現在では腎臓より調製した一次培養細胞のみが Klotho 遺伝子を発現していることから、ファックスで細胞の濃縮を試みている。

Klotho 遺伝子座に lacZ 遺伝子をノックインしたマウスの作成に成功したところから、このマウスの解析により、PCR レベルでしか発現が確認されなかった組織での発現細胞の同定、及び、Klotho 欠損における発現細胞の運命、機能を検討している。

II. 老化症状の成り立ちの解明

1) Klotho ホモマウスの変異表現型

基本的な変異表現型は既に報告済みであるが、新たに明らかになったことを記載

する。B 細胞の分化異常があり、PreB 細胞で分化が止まる細胞が多い。血球系の stem にあたる細胞を分離し、試験管内で分化誘導すると分化が正常に進行することから、骨髄内の細胞環境の問題と推測している。

難聴であることが確認され、聴覚に関連する神経細胞の減少が示唆されている。Klotho は神経系の変異に乏しいと考えられてきたが、詳細に解析する必要性を示唆していると判断している。

Klotho マウスにおける骨密度の低下機構を解析するために、化骨、破骨機構、骨代謝関連遺伝子の解析を行ったところ、化骨、破骨細胞の減少、機能の低下が観察され、低回転性の骨密度の低下との結果をえた。BMP をはじめとする各種の骨代謝関連遺伝子の発現を解析したが、変化が観察されなかった。しかし、肝臓で合成、分泌される OPG (破骨細胞の分化を抑制する) の顕著な発現増加が観察された。

野生型マウスより卵巣を摘出し、そこに、Klotho マウスの卵巣を移植したところ、卵巣肥大、卵胞の成熟が観察され、妊娠を確認した。そこで、Klotho マウスに性腺刺激ホルモンを投与したが、Klotho 非存在下では反応しなかった。

Klotho マウスは null 変異でなかったことから、null ノックアウトマウスを作成した。その変異表現型は基本的には Klotho マウス系統と一致しているが、やや軽いように思われる。この違いはおそらく、遺伝的背景の違いを反映したものと考えられる。

2) ヘテロマウスを用いるストレス負荷実験

ヘテロマウスでは Klotho 遺伝子の発現が半減しているが、生後数ヵ月の観察では組織学的な異常が観察されなかったが、ヘテロマウスに高脂肪食の摂取、たばこの煙を吸わせるなどのストレスをかけたところ、動脈硬化、肺気腫を高発した。

III. ヒト疾患解明への応用

1) ヒト遺伝子のポリモルフィズムの検討、ヒト老化症との関連解析

ヒト Klotho 遺伝子座は 13q12 であるが、現時点では本領域に遺伝性疾患を同定できない。また、ポリモルフィズムについても、特に強くリンクする疾患を見い出していない。

2) 腎不全患者における Klotho の発現

腎摘出患者より提供された腎組織における Klotho mRNA 量、Klotho 蛋白量を測定した。コントロールとして、摘出腎癌の健常部を解析した。Klotho 遺伝子の発現は腎不全患者の腎組織では顕著に低下しており、欠損症と判断される。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

○Matsumura Y., Aizawa H., Shiraki-Iida T., Nagai R., Kuro-o M., Nabeshima Y.

- Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted Klotho protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 242, 626-630 (1998)
- Shiraki-Iida T., Aizawa H., Matsumura Y., Sekine S., Iida A., Anazawa H., Nagai R., Kuro-o M., Nabeshima Y. Structure of the mouse Klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Letters* 424, 6-10, (1998)
- Saito Y., Yamagishi T., Nakamura T., Ohyama Y., Aizawa H., Suga T., Matsumura Y., Masuda H., Kurabayashi M., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nagai R. Klotho protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 248, 324-329 (1998)
- Aizawa H., Saito Y., Nakamura T., Inoue M., Imanari T., Ohyama Y., Matsumura Y., Masuda H., Oba S., Mise N., Kimura K., Hasegawa A., Kurabayashi M., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nagai R. Downregulation of the klotho gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 249, 865-871 (1998)
- Yamashita T., Nifuji A., Furuya K., Nabeshima Y., Noda M. Elongation of the epiphyseal trabecular bone in transgenic mice carrying a klotho gene locus mutation that leads to a syndrome resembling aging. *J. Endocrinology* 159, 1-8 (1998)