

「ゲノムの構造と機能」
平成12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)

「klothoマウスをモデルとしたゲノム機能の体系的研究」

1. 研究実施の概要

飛躍的に発展した分子生物学の成果により、生物の営みに関する膨大な知識がもたらされ、また、ゲノムプロジェクトの進展はヒトをはじめ、各種の生物の全ゲノム構造を明らかにしようとしている。今、求められていることは「どのようにして、この膨大なゲノム情報を統合的に解析し、生命現象の理解と新たな概念の構築に発展させるか」を提示することである。

申請者は、思わぬ発見を端緒としてklothoマウスの老化機構を解析しているが、このマウスは「生物の営みに関する膨大な知識とメガゲノム情報の統合的な解析」を展開するための「ユニーク、かつ優れたモデルシステム」であると考えている。なぜなら、klothoマウスを解析の場として、遺伝子素因、遺伝子多型、遺伝子発現プロファイルの変化などの「ゲノム科学が次にチャレンジすべき実験」に取り組むことの重要性を支持する基礎的データが得られており、しかも、これらの実験を実施することによって、個体老化研究の新展開と飛躍的な発展がもたらされると期待されるからである。

本計画ではklotho変異マウスをモデルシステムとしてゲノム機能の体系的解析を行い、ゲノム科学の発展と個体老化の分子機構の解明を図ることを計画しており、以下の5点にわたる研究を推進する計画をたてて準備を始めたところである。

- (1) ゲノム情報の体系的解析による老化の成り立ちに関する遺伝子群の研究
- (2) 加齢疾患の発症、症状の個体差に關与する遺伝子素因の研究
- (3) 遺伝子多型とヒト加齢関連疾患との連鎖に関する研究
- (4) 新たな個体レベルの遺伝子機能解析システムの開発に関する研究
- (5) 生命維持機構の統合的理解とその分子基盤、臨床応用に関する研究

本研究の発展によりポストシーケンス時代の遺伝子研究の新たな方法論の確立、ゲノムの詳細な機能解析に不可欠な新たな遺伝子機能解析技術の開発、老化現象や加齢に伴う疾患の分子機構の解明とその医学的応用など、多岐におよぶ研究成果が得られると期待される。

2. 研究実施内容

研究プロジェクトの開始にともない、チームを編成し、新たな研究の基盤となる実験をスタートした。

(1) ゲノム情報の体系的解析による老化の成り立ちに関する遺伝子群の研究

老化や加齢疾患の理解のためには多面的な解析が必須であり、遺伝子発現の体系的解析は重要な課題である。本課題はNIHの洪との共同研究であることから、具体的な検討を始めたところである。一方、理研ゲノムサイエンスセンターの協力によりDNAアレイを用いて正常マウスと*klotho*マウスの腎臓における発現プロファイル変化の網羅的解析を開始した。

(2) 加齢疾患の発症、症状の個体差に關与する遺伝子素因の研究

ヒト疾患の病態には主要な疾患遺伝子に加えて多数の修飾遺伝子が關与しており、病態のより深い理解にとって、主要疾患遺伝子と修飾遺伝子間の相互作用の解明は不可欠である。同様にマウス突然変異の表現型は、その変異がどのような系統の遺伝的背景にあるかによって大きく変化する。そこで、*klotho* 遺伝子変異を修飾する遺伝子の同定を目的として遺伝子背景の異なるMSMマウスと掛け合わせを行い、遺伝的背景の影響を解析した。*klotho* ホモ個体は、成熟前に発症し、生後100日以内に全て死亡する。しかし、標準的近交系と大きな遺伝的距離を有する日本産野生マウス由来のMSM系統に*klotho* 変異を導入した戻し交配第6世代 (MSMバックグラウンドに変換されている) において*klotho* ホモ個体を作製したところ、全ての個体が100日以上生存し、生殖能を示すようになる。しかも、2, 3ヶ月の経過で多彩な症状を発症し、死亡する。この結果は、MSM系統には*klotho* 遺伝子変異を抑制する遺伝子が存在することを示している。次いで、修飾遺伝子を同定するために、MSMとB6のコンソミック系統との掛け合わせを行っており、最終的には遺伝子座の特定、修飾遺伝子の分離へと研究を進める。

(3) 遺伝子多型とヒト加齢関連疾患との連鎖に関する研究

ヒト*klotho* 遺伝子の解析により、日本人においては6カ所、英国人においては9カ所のSNPsが同定され、そのうちの3カ所(プロモーター領域の1カ所、exon 4の2カ所)は共通であった。この3カ所のSNPsと、動脈硬化症、骨密度の低下、肺気腫、糖尿病との相関を解析し、疾患の発症・進展に直接關与しているSNPsの特定を目指す。また、プロモーター領域の遺伝子多型と血清*Klotho* 蛋白量との相関について解析する。

(4) 新たな個体レベルの遺伝子機能解析システムの開発に関する研究

老化のような複雑な統合的現象を解析するためには、試験管内実験と共に個体レベルの遺伝子機能の解析が必須である。また、その解析は多岐に及ぶ。ところが、これまでの個体レベルの実験システムでは、ポストシーケンス時代のゲノ

ム研究に対応できない。そこで本プロジェクトでは新たな方法の開発により個体レベルの遺伝子機能解析能力の飛躍的發展を図ることとした。「特定の組織や細胞においてターゲット遺伝子に点変異を導入する方法の開発」についてはこれまでの検討によりスプライシングの制御とCre-loxPシステムを利用することにより新しい実験系を確立した。また、 β -*klotho* 遺伝子のノックアウトマウスを作成する際に「ターゲット遺伝子に多種類の遺伝子変異を順次導入する方法の開発」を目的とした仕組みを入れており、既に新しい方法を検討するためのマウス個体ができている。

(5) 生命維持機構の統合的理解とその分子基盤、臨床応用に関する研究

これまでの研究結果を基盤として、*Klotho*の機能について以下の研究を行った。

分泌型を高感度に認識する抗体を用いて、ヒト、およびマウスの血清中に130kd分泌型が存在することを確認し、サンドイッチエライザー測定系を開発している。測定系の完成のためには、血清中に存在する反応を阻害する夾雑物を取り除く必要があり、測定系のbrush upを図っている。

活性中心の構造に変異があるとはいえ、構造的には β -Glucosidaseに相同性があることから、酵素活性の有無を追求してきたが、糖鎖切断活性を強く支持する結果が得られ、至適反応条件を検討している。*Klotho*蛋白は少なくともターゲット分子の糖鎖を修飾対象、あるいは認識対象の一部としていると推定された。

これまでの解析により、機能を現すには全長型、あるいは全長に近い130kd分泌型を発現させる必要があると推定される。この点を確認するために、膜貫通ドメインのN端側にストップコドンを挿入し、全ての外来性の*Klotho*蛋白が分泌されるトランスジェニックマウスの作成、並びに精製した130kd分泌型の投与実験を開始している。

klotho 変異マウスの解析により老化症状の発症には生体の恒常性維持機構の破綻が大きく関わっていることが示唆されている。とりわけ、カルシウム、リン酸ホメオスタシスにおける*Klotho*の役割は重要であり、尿細管細胞ではカルシウム、リン酸ホメオスタシスに関連する重要な遺伝子がそろって発現しており、更に、*Klotho*変異マウスでは電解質制御の鍵となる遺伝子の発現変異が観察される。次の課題はどのシグナル伝達カスケードのどの分子に*Klotho*が作用しているかを明らかにすることである。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

無し