

「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

本計画は（１）生命維持機構の統合的理解とゲノム情報の体系的解析による老化の成り立ちに関与する遺伝子群の研究、（２）加齢疾患の発症、症状の個体差に関与する遺伝子素因の研究、遺伝子多型とヒト加齢関連疾患との連鎖に関する研究、（３）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を目的としており、14年度は以下の成果をえた。

(A) Klotho結合分子を同定し、Klotho蛋白複合体が腎尿細管、脈絡膜においてカルシウムの輸送制御に機能している (B) Klotho蛋白が活性型ビタミンD合成の律速酵素である1 α -hydroxylaseの発現を負に制御するネットワークの重要な構成要素であり、Klotho蛋白複合体の機能低下による血清ビタミンD、カルシウム、リン濃度の上昇が多彩な変異症状を引き起こす重要な要因となっている (C) Klotho蛋白は β -glucuronidase活性を示し、その基質の活性化を介して機能していると推定される (D) Klotho変異マウスでは μ Calpainの顕著な活性化がおこり、容易に細胞が崩壊する (E) 骨密度の低下と連鎖するKlotho遺伝子多型を発見し、また、Klotho発現亢進患者が電解質代謝異常を呈することを解析した (F) 遺伝子背景を変化させるとKlotho変異マウスの寿命が延長することが明らかとなっており、修飾遺伝子の解明へと進んでいる。(G) β -klotho遺伝子のノックアウトマウスの解析により、 β -klotho蛋白がコレステロールホメオスタシスの制御を担っていることが示唆された。

2. 研究実施内容

(1) Klotho蛋白複合体の機能解析

抗Klotho蛋白抗体を用いた免疫沈降により野生型マウスサンプルでは共沈するが、Klotho変異マウスサンプルでは共沈しない蛋白を分離し、質量分析によりKlotho蛋白と結合する分子としてNa 3つの蛋白を同定した。Klotho蛋白複合体は細胞内外の電解質バランス、浸透圧制御を制御する重要な複合体であり、その分子機構の解析を行っている。

(2) Klotho蛋白によるカルシウムホメオスタシスの維持機構について

Klotho変異マウスでは活性型ビタミンD合成の律速酵素である1 α -hydroxylaseが顕著

に亢進しているが、その制御に関わるPTH、CT、活性型ビタミンDのシグナルは作動しており、Klotho蛋白の欠失がその発現上昇の要因となっていること、活性型ビタミンDがKlothoの発現を誘導することからKlotho蛋白が 1α -hydroxylaseの発現を負に制御するネットワークを構成する分子であることを明らかにした。次のそのシグナル伝達機構を明らかにすることを計画し、解析中である。

(3) Klotho蛋白の酵素活性に関する研究

Klotho蛋白はType 1 glycosylaseの一員であることから、分泌型Klotho蛋白を培養細胞で高発現させ、単糖類の人工基質を用いて酵素活性を解析したところ、 β -Glucuronidase活性をもつことが明らかになった。また、基質特異性が高く、glucose、galactoseを切断する活性はもたず、 β -Glucuronidase阻害剤で阻害される。次の課題は生体内基質を探る手がかりを得ることであるが、グルクロン酸をもつ分子が基質の候補と推定され、プロテオグリカン、アルカロイド、ステロイドホルモン、糖脂質、フラボノイドなどが解析対象となる。competitive inhibition候補分子をしぼり込み、基質の同定へと進もうとしている。

(4) カルシウムによる μ Calpainの活性化と老化関連疾患の発症に関する研究

Klotho変異マウスではカルシウム依存性蛋白分解酵素； μ Calpainが顕著に活性化され、細胞崩壊を引き起こすこと、並びに野生型マウスでも加齢に伴いKlotho蛋白の発現が低下し、 μ Calpainが活性化され、加齢に伴う細胞崩壊との関連を示唆する結果をえた。 μ Calpainの活性化はKlotho蛋白の欠損により細胞のカルシウム感受性が変化したこと、あるいは、細胞内カルシウム量の増大によってもたらされている可能性が高く、カルシウムの制御に関わるシグナル伝達経路を解析している。

(5) ヒトklotho遺伝子座の遺伝子多型の解析

ヒトklotho遺伝子座の多型解析により7カ所の遺伝子多型がみつき、骨密度の低下やカルシウム代謝異常、肥満などとの関連が示唆される結果をえていたが、詳細な解析により日本人閉経後女性においても、promoter領域およびexon4の多型が骨密度の低下と有意な相関を示したことから、klotho遺伝子産物が、老化に伴う骨粗鬆化に関与している可能性が示された。遺伝子多型によるアミノ酸置換、promoter領域の置換がその発現量、分泌量、酵素活性にどのような影響を与えるかなどを解析中である。

(6) Klotho遺伝子の変異を修飾する遺伝子の同定

Klotho変異マウスの老化関連表現型が異なった遺伝的背景で修飾されるか否かを検討するため、この突然変異遺伝子を通常の実験用近交系マウスと大きな遺伝的距離を有する日本産野生由来のマウス系統であるMSMの遺伝的背景に戻し交配によって置換した。このMSM・TA20系統では、平均寿命の延長や精巣における精子形成能の回復および腎臓における形態学的な組織破壊など、元のTA20マウスとは異なった表現型を示していた。このことから、MSMマウスの遺伝的背景にはKlotho変異の表現型を修飾する遺伝子が存在する事がわかった。

(7) β -klotho遺伝子のノックアウトマウスの解析

β -klotho遺伝子は肝臓、小腸粘膜上皮細胞、脂肪細胞、膵臓の外分泌細胞で発現しており、コレステロール代謝、脂肪代謝との関連が推定されていたが、ノックアウトマウスの解析により、コレステロール代謝関連遺伝子の発現量や、これらの遺伝子の性差による発現の差異に大きな異常が見いだされ、 β -klotho遺伝子がコレステロール代謝の重要な制御因子であることが明らかとなりつつある。

3. 研究実施体制

機能解析グループ

鍋島陽一 京都大学医学研究科、教授

Klotho蛋白の機能解析、ゲノム解析技術の開発

遺伝子素因解析グループ

城石俊彦 国立遺伝学研究所、教授

加齢疾患の成り立ちと発症、系統差、個体差に関与する遺伝子素因の解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Yoshida T., Fujimori T., Nabeshima Y.
Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal α -hydroxylase gene. *Endocrinology* 143, 683-689 (2002)
- Ito S., Fujimori T., Hayashizaki Y., Nabeshima Y.
Identification of a novel mouse membrane-bound family 1 glycosidase-like protein, which carries an atypical active site structure. *Biochem. Biophys. Acta* 1576(3) 341-345, (2002)
- Kashimada K., Yamashita T., Tsuji K., Nifuji A., Mizutani S., Nabeshima Y., Noda M.
Defects in growth and bone metabolism in klotho mutant mice are resistant to growth hormone treatment. *J. Endocrinology* 2002 Sep;174(3):403-410.
- Manya H., Fujimori T. Nabeshima Y., Endo T.
Klotho protein deficiency leads to overactivation of (Mu)-calpain
J. Biol. Chem. 277 (38) 35503-35508 (2002)
- Kawano K., Ogata N., Chiano M., Molloy H., Kleyn P., Spector T.D., Uchino M., Hosoi T., Suzuki T., Orimo H., Inoue S., Nabeshima Y., Nakamura K., Kuro-o M., Kawaguchi H.
Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. *J. Bone and Mineral Res.* 17(10) 1744-1751 (2002)
- Yamashita T, Okada S, Higashio K, Nabeshima Y, Noda M.

- Double mutations in *klotho* and osteoprotegerin gene loci rescued osteopetrotic phenotype. *Endocrinology*. 2002 Dec; 143(12): 4711-7.
- Takeshita K., Yamamoto K., Ito M., Kondo T., Matsushita T., Hirai M., Kojima T., Nishimura M., Nabeshima Y., Loskutoff D.J., Saito H., Murohara T. Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 with fibrin deposition in a murine model of aging, *Klotho* mouse. *Semin Thromb Hemost.* 28(6):545-553 (2002)
 - Nagai T., Yamada K., Kim H-C. Kim Y-S. Noda Y., Imura A., Nabeshima Y., Nabeshima T. Cognition impairment in the genetic model of aging, *klotho* gene mutant mice: A role of oxidative stress. *Faseb J.* 17(1) 50-52, (2003)
 - Yang J., Matsukawa N., Rakugi H., Imai M., Kida I., Nagai M., Ohta J., Fukuo K., Nabeshima Y., Ogihara T. Upregulation of cAMP is a new functional signal pathway of *Klotho* in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 301(2) 424-429 (2003)
 - Nabeshima Y. *Klotho*: A fundamental regulator of aging. *Ageing Res. Rev.* 1(4) 627-638 (2002)
 - Furuse, T., Blizard, D. A., Moriwaki, K., Miura, Y., Yagasaki, K., Shiroishi, R. and Koide T.: Genetic diversity underlying capsaicin intake in the Mishima battery of mouse strains. *Brain Res. Bull.* 57, 49-55 (2002)
 - Isobe, T., Yoshino, M., Mizuno, K-I., Lindahl, K. F., Kiode, T., Gaudieri, S., Gojobori, T. and Shiroishi, T.: Molecular characterization of the Pb recombination hotspot in the mouse major histocompatibility complex class II region. *Genomics*, 80, 229-235 (2002)
 - Furuse, T., Takano-Shimizu, T., Moriwaki, K., Shiroshi, T. and Koide, T.: QTL analyses of spontaneous activity by using mouse strains from Mishima battery. *Mammal. Genome.* 13, 411-415 (2002)
 - Yada, Y., Makino, S., Chigusa-Ishiwa, S. and Shiroishi, T.: The mouse polydactylous mutation, *luxate (lx)*, causes anterior shift of the anteroposterior border in the developing hindlimb bud. *Limb special issue, Int. J. Dev. Biol.* 46, 975-982 (2002)
 - Hide, T., Hatakeyama, J., Kimura-Yoshida, C., Tian, R., Takeda, N., Ushiro, Y., Shiroishi, T., Aizawa, S. and Mtasuo, I.: Genetic modifiers of otocephalic phenotypes in *Otx2* heterozygous mutant mice. *Development* 129, 4347-4357 (2002)

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：0件