

「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

多彩な老化症状を呈する早期老化マウスを発見し、ヒトの老化疾患解析の重要なモデルマウスであると提唱し (Nature, 1997)、その原因遺伝子 α -Klotho の機能解析、並びにホモログである β -Klotho の機能解析を進めてきた。この解析を通して α -Klotho は電解質、浸透圧などの体液バランスの制御に関与しており、また、 β -Klotho は肝臓、膵外分泌細胞、小腸粘膜上皮、脂肪細胞で発現しており、コレステロール、胆汁酸代謝とその腸肝循環を制御することによってコレステロールホメオスタシスの制御に関与していることを見いだした。

次にKlotho分子の機能解明を目的として結合分子としてNa⁺/K⁺ ATPaseを同定し、その複合体の役割と分子機構解明へと研究を進めてきた。その結果、細胞外の変化を細胞表面のセンサーが認識し、そのシグナルがKlotho・Na⁺/K⁺ ATPase複合体に伝えられ、Klotho・Na⁺/K⁺ ATPase複合体の細胞表面への移動、ひいてはNa⁺/K⁺ ATPaseの表面量、即ち機能が制御されていることが示唆された。

今後の課題は、細胞が細胞外の変化に応答する仕組みとその分子機構、とりわけ、Klothoの位置づけを明らかにすることである。いろんな変化に対する応答には個体のおかれた状況や遺伝的背景の違いに基づく揺らぎがあり、それが個体差をもたらし、疾患の発症や症状の違いに反映している可能性が高い。生物の揺らぎや個人差をどのようにして科学的解析の対象とするかは今後の課題であるが、Klotho変異マウスの研究は応答における振幅の違いや揺らぎを解析対象の一部としている。よって、この研究の延長線上に生物の揺らぎや個体差の科学を対象とするような新しい研究領域が浮かび上がる可能性がある。

2. 研究実施内容

研究の目的

これまでの研究で (1) KlothoはNa⁺/K⁺ ATPaseと複合体を形成し、遠位尿細管、脈絡膜細胞における電解質、水輸送の制御、副甲状腺における副甲状腺ホルモンの分泌制御に機能していることが示唆されること、(2) 細胞外の変化に反応してNa⁺/K⁺ ATPaseの機能が制御されており、また、細胞外の変化を認識するセンサーが介在すること、(3)

Klothoは細胞内ERに大量に存在し、細胞膜への移動、切断（膜貫通ドメインのN端側で切断されて分泌型となる）を介して、その機能が制御されていると推定されること、（4）第二の分子、 β -klotho遺伝子はコレステロールの腸肝循環の制御因子として機能していることなど、Klothoの機能、生物学的な役割について重要な進展があったことから、16年度は、これらの知見を更に詳細に検討し、発展させることを目標とした。

研究の経過

抗Klotho蛋白抗体を用いた免疫沈降、質量分析によりKlotho蛋白結合分子として Na^+/K^+ ATPaseを同定した。Klotho発現細胞では Na^+/K^+ ATPaseの機能が細胞外の変化に応答して変化するか否かを検討した。また、血清カルシウム濃度を下げる方法を開発し、野生型、Klotho変異マウスを用いて副甲状腺ホルモンの分泌制御とKlothoの関係を解析した。次いで、このシグナル経路に介在する分子を明らかにする目的で培養細胞実験系の確立を試みた。この解析と関連して、Klothoの細胞内ERから細胞膜への移動、細胞膜上での切断の意義を解析する目的で切断されると推定される部分を置き換えた分子を構築し、切断の意義の解明につなげようとしている。

脂肪細胞、肝臓、膵臓の外分泌腺などで発現する第2の分子、 β -klotho遺伝子のノックアウトマウスではコレステロールを胆汁酸へと変換する酵素遺伝子（Cyp7A1, Cyp8B1）及びHMG CoA Reductaseの亢進、糞便へのコレステロール、胆汁酸の排泄について詳細に解析した。また、コレステロール負荷による関連酵素活性の変化、コレステロール結石の形成等を検討した。 β -klotho結合分子の同定を目指して候補分子の質量分析を行った。

研究の成果

（1）Klotho蛋白の機能解析—1（Klotho結合蛋白の同定と作用機作の解明）

- （A）抗Klotho抗体による免疫沈降と質量分析によって野生型脈絡膜からは沈降するが変異マウスの脈絡膜からは沈降しない蛋白の同定を試み、 Na^+/K^+ ATPaseを見いだした。また、逆に Na^+/K^+ ATPaseの α -subunitを免疫沈降すると Na^+/K^+ ATPaseの β -subunit及びKlothoが共沈することがわかり、Klotho蛋白が Na^+/K^+ ATPaseと結合していることを確認した。更に、この結合は腎臓、上皮小体においても確認された。
- （B）脈絡膜における Na^+/K^+ ATPaseの活性をルビジウム（Rb）の取り込みにより、また、 Na^+/K^+ ATPaseの細胞表面量をウアバイン（トリチウムラベル）の結合量で測定したところ、野生型では細胞外カルシウム濃度、浸透圧の低下に従ってRbの取り込み活性と Na^+/K^+ ATPaseの細胞表面量が増大するが、Klothoを欠失するとこの様な応答が起こらないことが明らかとなり、Klotho蛋白は細胞外の変化に素早く応答して Na^+/K^+ ATPaseの細胞表面へのリクルートを制御することによって Na^+/K^+ ATPaseの機能を調節していることを証明した。
- （C）センサー候補の阻害剤、特異的なリガンドを添加することにより細胞表面でカルシウム濃度の変化や浸透圧の変化を感知し、 Na^+/K^+ ATPaseの活性、細胞表面へのリクルートを制御するシグナルを伝える分子の候補を同定した。ついで、同分子

のノックアウトマウスを入手し、解析を進め、当該分子が細胞表面でセンサーの役割を担っていることを解析した。

(D) Klotho蛋白は膜貫通ドメイン及び、そのN端側で切断されて分泌されるが、Na⁺/K⁺ATPaseの細胞表面へのリクルートとKlotho蛋白の分泌が同時に起こり、相関していた。

(E) 関連分子の遺伝子をHeLa細胞に導入し、上記の制御システムを培養細胞系で再構成することに成功した。

これらの事実を総合して、例えば細胞外のカルシウム濃度が低下すると、その低下をセンサー分子が感知し、シグナルをKlotho・Na⁺/K⁺ATPase複合体に伝え、Klotho蛋白の構造変化、Klotho蛋白の細胞内ドメインと結合する分子との解離、あるいはKlotho蛋白の切断が起こり、Na⁺/K⁺ATPaseが細胞表面へと移動し、機能を発揮すると推定しており、培養細胞再構成系を用いてその詳細を解析している。

(2) Klotho蛋白の機能解析—2 (Klotho蛋白による副甲状腺ホルモンの分泌制御)

(A) 血清カルシウムの低下を誘導すると野生型マウスでは直ちに副甲状腺ホルモン(P TH)の分泌が起こるがKlotho変異マウスではほとんど分泌しない。また、取り出した上皮小体においてもこの反応が確認された。

(B) 生化学的解析、電子顕微鏡による観察で、Klotho変異マウスにおいても十分量の成熟型P THが合成され、分泌顆粒を形成していることが明らかとなった。

(C) In vitro解析系にウアバインあるいは細胞表面のセンサー分子の阻害剤を添加するとカルシウム濃度の低下によるP THの分泌が抑制された(投稿中)。

この結果から、上皮小体においても低カルシウムシグナルはセンサーチャンネルによって感知され、Klothoに依存したNa⁺/K⁺ATPaseの機能調節を介して副甲状腺ホルモンの分泌が制御されていることが明らかとなった。これまで、P THの分泌を促すシグナルはカルシウム感受性受容体(CaSR)が担っていると信じられてきた。即ち、高カルシウム、あるいは正常カルシウム濃度ではCaSRからP THの分泌を抑えるシグナルが入り、低カルシウムになると、この抑えるシグナルが解除されP THが分泌されると考えられてきた。一部に分泌を促進するシグナルの存在を主張する少数派との間で議論が続いていたが、その実体は判らぬままであった。ところが、今回の解析で、低カルシウムを認識し、P THの分泌を促す正のシグナルがカルシウム感受性受容体(CaSR)とは異なるチャンネルより入ることが示されたことにより、多年にわたる論争に一石を投じる結果となった。また、80年代にウアバインを投与してNa⁺/K⁺ATPaseの機能をブロックするとP TH、インシュリン、ヒスタミンの分泌が抑えられることが報告されているが、その理由が全く判らず放置されてきた。今回の結果はこれらの観察に根拠を与え、根底に存在する共通の分子機構解明の突破口となると考えている。

(3) Klotho蛋白の機能解析—3 (Klotho蛋白は多彩な恒常性維持機構に関与している)

Na⁺/K⁺ATPaseは細胞内外のNa⁺、K⁺の濃度勾配を作り出すことによって「細胞を細胞たらしめている分子」である。又、Na⁺の濃度勾配に依存してH⁺、リン、カルシウム、グル

コースなどの取り込み、細胞内輸送、汲みだし、更に水バランス、浸透圧バランスなど様々なことが制御されている。興味深いことにklotho変異マウスにおいてもカルシウム異常のみならず、低血糖、尿糖、多尿、高リンなどの多面的な異常や水・浸透圧バランスの破綻を示唆する現象が観察され、また、応答能の破綻を反映してこれらの値は揺らいでいた。これらの結果はKlothoがカルシウムのみならず多面的な因子のホメオスタシス制御に関わっていることを示唆している。

(4) Klotho変異マウスからみた個体老化

Klotho変異マウスの発見以来、Klotho変異と多彩な変異表現型がどのように結びつくのか大きな謎であったが、Klotho蛋白がNa⁺/K⁺ ATPase と結合しており、細胞外の変化に素早く応答してNa⁺/K⁺ ATPaseの細胞表面へのリクルートを制御することによって動物個体の恒常性の維持機構に関わっていることが明らかにされ、また、klotho変異マウスでは生体の変化に対する応答能が破綻していることが示されたことによって本質的な理解に到達した。老化は加齢に伴う生体応答能の低下、生理機能の減退に伴う複合的な過程であると捉えられており、Klotho変異マウスは生体応答能の破綻に伴って加齢関連変化が顕著に現れた例と捉えられる。

(5) Klotho変異を修飾する遺伝子の検索

城石は、今回、オリジナルの挿入変異のkolothoアレルに加えて、ノックアウトKlothoアレルを標準的な実験用マウスであるC57BL/6J (B6)と野生マウス由来系統であるMSMの遺伝的背景にはほぼ完全に置き換えたコンジェニック系統を樹立した。MSM系統の遺伝的背景では、オリジナル挿入アレルほどの寿命の延長は認められなかったが、一方、B6系統とのF2交配集団の解析では、分離個体の寿命に大きな個体差が認められた。この結果は、klotho機能と相互作用する修飾遺伝子がMSMのみならずB6系統の遺伝的背景にも存在することが示している。これらの遺伝子に対するQTL解析が現在進行中であり、今後コンソミック系統による解析系へ移行する準備を進めている。

(6) 組織、あるいは時期特異的にターゲット遺伝子に点変異を導入する方法の開発

個体レベルで遺伝子機能を詳細に解析するにはこれまでのノックアウト、細胞・時期特異的ノックアウト、トランスジェニックマウス技術では不十分であり、更なる遺伝子機能解析技術の開発が必要である。その一貫として、Cre-loxPシステムとスプライシングの制御を組み合わせ、組織、あるいは時期特異的にターゲット遺伝子に点変異を導入する方法を開発した。

従来より、海馬が記憶、学習に関与する重要な部位であると同時に、その傷害が統合失調症、鬱病などの精神疾患とも関連することが報告されていたが、今回、この方法を応用してターゲット遺伝子としてNMDA受容体のNR2A遺伝子を用いて、海馬歯状回のみで神経興奮（脱分極）に伴うカルシウム流入を制御しているMg²⁺ブロック機構に必要なアミノ酸であるアスパラギンをグルタミンに変換し、海馬歯状回のみでMg²⁺ブロックが解除されるマウスを作成し、行動解析を行ったところ、活動量の亢進、プレパルスインヒビションの顕著な源弱など、多彩な行動異常が観察された。これらの行動異常は薬物投与で作成された

精神疾患モデルマウスや統合失調症患者で観察される行動異常パターンと類似しており、また、向精神薬の一つであるハロペリドールの投与により行動異常が改善することから、海馬歯状回が精神行動形成に重要な生理的役割を負っていることを示唆する結果と考えている。

(7) 副次的成果

第2のKlotho、 β -Klothoを同定した。この遺伝子は肝臓、膵臓の外分泌細胞、脂肪細胞で発現しており、そのノックアウトマウスを作成したところ、コレステロールから胆汁酸を合成する経路の律速酵素であるCyp7A1、並びにCyp8B1の亢進が観察され、糞便より多量の胆汁酸を排泄していた。結果として体内より多量のコレステロールを排出する結果をもたらし、軽い体重減少がおこるが、血清学的、形態学的解析では異常が見いだされず、また、食餌による高コレステロール負荷をかけてもコレステロール胆石ができないなど、興味ある変異表現型を示した。 β -Klothoはコレステロールホメオスタシスを制御する重要な分子として機能しており、その作用メカニズムの解明を目指して解析中である。

分泌型Klothoの機能を検討するためにTgマウスを作成したところ、挿入突然変異によって小脳皮質を完全に欠損しているマウス系統が樹立された。分子遺伝学的解析により原因遺伝子としてPtfla (bHLH) を同定した。Ptflaの欠失により小脳の全てのGABAニューロンが失われ、小脳に投射する基底核が消失する。また、Ptfla遺伝子を大脳のNMDAニューロンが発生する脳室帯で発現させると、本来、NMDAニューロンになるべき細胞がその形態、細胞移動の様式を含めてGABAニューロンに分化した。よって、Ptfla遺伝子は小脳のGABAニューロンのマスター遺伝子であると推定された。なお、小脳皮質を完全に失ってもマウスは生存可能で、既に2年間生存している (Neuron revised)。

今後の見通し

Klotho・Na⁺/K⁺ ATPase複合体が関わる現象の全体像を明らかにしつつ、その分子機構を解明すること、並びに制御機構の破綻がどのようにして加齢関連疾患をもたらすかを解析すること。また、 β -klotho結合分子の同定を進め、 β -klothoがコレステロール代謝を制御する仕組みを解析することができると判断している。具体的には以下の5項目の研究の進展が期待される。

- 1) Klotho・Na⁺/K⁺ ATPase複合体が関わる多彩な生命現象の全体像の解明
- 2) 細胞外の変化をKlotho・Na⁺/K⁺ ATPase複合体に伝えるシグナル伝達機構の解明
- 3) Klotho・Na⁺/K⁺ ATPase複合体の細胞表面へのリクルートを制御する分子機構の解明
- 4) 生体応答能の破綻が多彩な変位表現型の発症プロセスと関わるかを解析し、同時に、この研究で明らかにされたことを手掛かりにヒトの加齢疾患の発症機構の理解を深める。
- 5) β -klothoとFGFがその受容体を介してシグナルを伝える仕組みとどのように関わるかを解析する。

3. 研究実施体制

機能解析グループ

- ① 研究分担グループ長：鍋島 陽一（京都大学大学院 医学研究科 教授）
- ② 研究実施項目：
 - (1) α, β -Klotho遺伝子改変マウスをモデルとしてカルシウム、コレステロールホメオスタシスの分子機構の解明を基盤とした生命維持機構の統合的理解
 - (2) ヒト加齢関連疾患との連鎖解析
 - (3) 新たな個体レベルの遺伝子機能解析システムの開発と疾患モデルの開発

遺伝子素因解析グループ

- ① 研究分担グループ長：城石 俊彦（大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 系統生物研究センター哺乳動物遺伝研究室 教授）
- ② 研究実施項目： α -klotho遺伝子変異を修飾する遺伝子素因の研究

カルシウムチャンネル解析グループ

- ① 研究分担グループ長：富永 真琴（自然科学研究機構 岡崎総合バイオサイエンスセンター生命環境領域細胞生理部門 教授）
- ② 研究実施項目：カルシウムシグナルに関連する分子の探索とその機能解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Tohyama O., Imura A., Iwano A., Jean Noel Freund, Henrissat B. Fujimori T., Nabeshima Y. Klotho is a novel β -glucuronidase capable of hydrolyzing steroid β -glucuronides. *J. Biol Chem.* 279(11) 9777-9784 (2004)
- K Takeshita, T Fujimori, Y Kurotaki, H Honjo, Hiroshi Tsujikawa, K Yasui, J-K Lee, K Kamiya, K Kitaichi, K Yamamoto, M Ito, T Kondo, S Iino, Y Inden, M Hirai, T Murohara, I Kodama, Y. Nabeshima Sinoatrial Node Dysfunction and Early Unexpected Death of Mice with a Defect of Klotho Gene Expression. *Circulation* 109(14) 1776-1782 (2004)
- Imura A. Iwano A., Kita N., Tohyama O. Fujimori T. and Nabeshima Y. Secreted Klotho protein in sera and CSF: Implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Letter* 565(1-3) 143-147 (2004)
- Shimada T., Takeshita Y., Murohara T., Sasaki KI, Egami K., Shintani S., Katsuda Y., Ikeda H., Nabeshima Y., Imaizumi T. Angiogenesis and

vasculogenesis are impaired in the precocious-aging Klotho mouse. *Circulation* 110, 1148-1155 (2004)

- Nabeshima Y. Klotho deficient mouse: an in vivo model for human aging. *Drug Discovery Today: Disease Models* Vol.1 (3) 223-227 (2004)
- Nemoto M, Morita Y, Mishima Y, Takahashi S, Nomura T, Ushiki T, Shiroishi T, Kikkawa Y, Yonekawa H, and Kominami R. Ahl3, a third locus on mouse chromosome 17 affecting age-related hearing loss. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 1283-1288, 2004.
- Abe K, Noguchi H, Tagawa K, Yuzuriha M, Toyoda A, Kojima T, Ezawa K, Saitou N, Hattori M, Skaki Y, Moriwaki K, and Shiroishi T. Contribution of Asan mouse subspecies *Mus musculus molossinus* to genomic constitution of strain C57BL/6J, as defined by BAC-end sequence-SNP analysis. *Genome Res.* 14, 2439-2447, 2004.
- Mandadi S, Numazaki M, Tominaga M, Bhat MB, Armati PJ and Roufogalis BD. Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium dependent desensitization of TRPV1 ion channels. *Cell Calcium* 35: 471-478, 2004.
- Dai Y, Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Kobayashi K, Yamanaka H, Tominaga M, Noguchi K. PAR2-mediated potentiation of TRPV1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *J. Neurosci.* 24: 4293-4299, 2004.
- Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S, Tominaga M. Sensitization of TRPV1 by EP₁ and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Molecular Pain* 1:3, 2005.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：1件）