

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「klothoマウスをモデルとしたゲノム機能の体系的研究」

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

鍋島 陽一 (京都大学大学院医学研究科 教授)

主たる共同研究者

城石 俊彦 (国立遺伝学研究所 教授)

富永 真琴 (自然科学研究機構 教授)

3. 研究内容及び成果

鍋島グループは、先に見出した老化マウス(klotho マウス)をモデルシステムとして個体の機能低下をもたらす老化の分子機構の解明を図ることを目的として本計画を提案した。より具体的には(1)老化と関連すると考えられる生命維持機構の分子基盤、臨床応用に関する研究、(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(3)老化の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である。

鍋島グループの今までの研究によって以下の点が明らかになった。老化関連疾患に類似の表現型を呈する Klotho 変異マウスの原因遺伝子 Klotho は I 型膜蛋白をコードしており、分子の大部分を占める細胞外ドメインは type1  $\beta$ -glycosidase と相同性をもつ。 $\beta$ -glycosidase の活性中心は2つの保存された配列からなっており、活性中心にあるグルタミン酸は種を超えて保存されているが、Klotho ファミリーでは、このグルタミン酸に置換がある。Klotho は PTH(副甲状腺ホルモン)を分泌する上皮小体、カルシウムの再吸収を担う腎臓の遠位尿細管、脳脊髄液産生の場合である脈絡膜、すなわち、血液や脳脊髄液などの細胞外カルシウム濃度の制御を担う組織で発現している。

鍋島グループは更に、Klotho が活性型ビタミン D 合成を負に制御すること、Klotho 変異マウスをビタミン D 前駆体を含まない餌で飼育すると血清活性型ビタミン D 値、カルシウム値が正常化すると同時に多くの変異表現型が改善すること、よって、活性型ビタミン D の過剰が大部分の変異表現型の要因であること、血清 Klotho 濃度が亢進している患者では血清中の活性型ビタミン D、カルシウム、リンが著しく低下し、多面的なカルシウム異常にもとづく症状が観察されること、ヒト Klotho 遺伝子多型を解析し、閉経後の女性の骨密度の減少に相関する遺伝子多型が存在することから 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あること、また、変異マウスでは細胞内の  $\mu$  Calpain 活性が顕著に亢進し細胞破壊がおこっていることなどを明らかにした。

更に鍋島グループは、Klotho は細胞内顆粒において  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ ATPase の高リン酸化フォームと特異的に結合しており、細胞外のカルシウム濃度の低下に素早く応答して  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ ATPase 機能を

調節していることなど、Klotho と Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase システムとの関係を明らかにした。

鍋島グループは Klotho ノックアウトマウスを C57BL/6J(B6)と MSM/Ms に、ほぼ完全に置き換えた系統を作成しその影響を調べた。その結果、(MSM×B6)F<sub>2</sub>-kl<sup>KO</sup>/kl<sup>KO</sup> 群において、寿命に大きな個体差が認められ、老化に関連する修飾遺伝子が B6 や MSM の遺伝的背景に存在する可能性が示唆された。

また α-Klotho ホモログである β-Klotho を同定し、そのノックアウトの解析により β-Klotho がコレステロールから胆汁酸を合成する律速酵素(Cyp7A1)の発現を負に制御することを明らかにした。Klotho、β-Klotho が循環している FGF のシグナル伝達に関わる可能性を提唱した。

鍋島グループは本課題に関連して、いくつかの技術の開発を行った。特に、部位特異的にターゲット遺伝子のアミノ酸配列を置換する方法を開発し、この方法を応用して海馬特異的に NMDA 受容体 NR2A のマグネシウムブロックを制御するアミノ酸に変異を導入し、その行動解析を行うことを可能にした。又、子宮内電気穿孔法によりマウス脳に遺伝子を導入し、個体レベルで導入遺伝子の機能を解析するシステムを開発した。また、子宮内電気穿孔法と RNAi の組み合わせにより動物個体で多数の遺伝子の機能低下を誘導する方法を開発し、神経細胞移動の分子メカニズムを解析するなどの技術開発も行った。また、小脳皮質を欠失したマウス系統を樹立し、その原因遺伝子として ptf1a(bHLH gene)を同定し、ptf1a が小脳において GABA 作動性ニューロンの運命決定を担うことを明らかにした。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

鍋島グループの「klotho マウスをモデルとしたゲノム機構の体系的研究」は老化のメカニズムを明らかにするという大きな期待のもとに始められたプロジェクトであり、その分、期待が高く、鍋島グループの研究成果に多大の期待が寄せられた。さて、プロジェクト終了にあたって、鍋島グループの研究成果については、新しい領域を切り開く難しさ、老化という極めて漠然とした生命現象を研究対象とする困難さ、また、老化現象を示す klotho マウスからヒトを含めた全ての老化のメカニズムを推測するという困難さが改めて明らかになったといえる。結論として、鍋島グループは、klotho マウスは生体のもつ恒常性(ホメオスタシス)に異常のあるマウスであり、それが様々な代謝系に影響を与え、究極的には老化を引き起こすという結論に至っていると思われ、Klotho 遺伝子の生体制御、特に代謝制御における役割についていくつかの興味深い知見が得られた。しかし、これが老化と具体的にどのように関係しているかという根本的な質問には、率直に言って明確な回答を明示できなかった。また、研究の性格上、やむをえない面があるが、論文の数が比較的少なく、特に超一流のジャーナルに発表がなかったことは残念であった。しかし細胞内のカルシウム代謝、また、ビタミンD代謝などに関していくつかの新しい知見が得られたことに対しては高い評価を与えても良いということが評価委員のコンセンサスであろう。

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

鍋島グループの研究成果の戦略目標、科学技術の貢献については事後評価委員とも高い評価を与えている。これは、研究(老化)対象細胞レベル、個体レベルなどが生物学的に見て大きくかつ、多面的なものである以上、ひとつの遺伝子(Klotho)研究からクリアカットな結論を得ることの難しさがその背景にあるが、そのような困難な課題に独創的手法でチャレンジした鍋島グループの研究はそれ相応の高い評価を与えても良いと思われる。また、鍋島グループの結論とした生体の恒常性「ホメオスタシス」の乱れを老化のひとつの要因とする考え方を支持する多くの実験結果をだしたことは世界の老化研究に大きな刺激をあたえたことは間違いないだろう。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

平成17年度 上原賞 受賞