

「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

本研究は、老化研究のユニークなモデル実験系である klotho マウスを用いて、個体老化、生命維持機構の統合的理解、老化疾患の成立に関連する遺伝子素因、遺伝子多型の解析、更に個体レベルの新たな遺伝子機能解析技術の開発に関する研究を行い、ゲノム研究の新たな方法論の開発と老化の分子機構、老化疾患の分子病態の解明を図ることを目的としており、以下の結果をえた。

(1) Klotho 蛋白の機能解析を行い、Klotho 蛋白が活性型ビタミンD合成の律速酵素である 1α -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ることを明らかにした。Klotho 変異マウスでは 1α -hydroxylase の顕著な発現亢進により血清ビタミンD、カルシウム、リン濃度が上昇し、多彩な変異症状を引き起こす重要な要因となっていることを証明した。また、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、細胞膜裏打ち蛋白を分解し、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、細胞崩壊が進行することを確認した。(2) ヒト klotho 遺伝子座の遺伝子多型の解析により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は、promoter 領域および exon4 の多型がこつ密度の低下と有意な相関を示した。よって 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。(3) 日本で樹立されたMSMマウスとの掛け合わせにより遺伝的背景を変えると Klotho マウスの寿命が約2倍となり、生殖能が改善することから、Klotho 遺伝子の変異を修飾する遺伝子の存在が示唆された。(4) 新たな個体レベルの遺伝子改変技術を開発する目的の一つとして、「任意の組織や任意のタイミングでターゲット遺伝子にアミノ酸置換や遺伝子変異を導入する方法の開発」に成功した。

更に、Klotho 蛋白が type1 glycosidase 活性をもつことを示唆する結果、Klotho 蛋白に結合する複数の分子の同定と構造解析、MSMマウスに存在する Klotho 遺伝子の変異を修飾する遺伝子座の解析、新たな遺伝子改変マウスの作成、新たな遺伝子機能を制御する方法の開発など、次の発展をもたらすための実験を進めており、これらのデータを基盤として更なる研究の進展を目指す予定である。

2. 研究実施内容

研究目的

本研究プロジェクトでは以下の4点を目的として研究を展開している。

- (1) *klotho* 変異マウスの解析、Klotho の分子機能の解析を基盤とした生命維持機構の統合的理解、老化の分子機構の解明。
- (2) ヒト *klotho* 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) *Klotho* 変異の解析を通して Epistatic interaction を解析し、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へと発展させる。
- (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

研究方法

(1) Klotho 遺伝子欠損マウスではカルシウムホメオスターシスを制御するシステムに異常を見いだしている。そこで、一連のカルシウム代謝関連遺伝子の発現と機能の変化を中心に解析し、どのシグナル伝達カスケードのどの分子の機能に Klotho 蛋白が作用しているかを解析し、分子病態解明の基盤とした。

Klotho 蛋白が結合あるいは修飾する生体内分子の解析は Klotho 蛋白の機能解明の根幹を成すものである。そこで、高感度の抗 Klotho 抗体を結合したビーズを用いて効率よく Klotho 蛋白を分離する方法を確立した。ついで、本ビーズにより Klotho 蛋白共沈分子を電気泳動で分離し、TOF-MAS 解析により候補分子を同定した。

Klotho 蛋白に酵素活性があることが示唆されており、最も有効な基質、至適反応条件の検討を行った。また、推定される活性中心に変異を導入した遺伝子を構築し、トランスジェニックマウスの作成を開始した。

(2) 日本人、英国人で共通に観察されたヒト *klotho* 遺伝子の 3 カ所の SNPs と、動脈硬化症、骨粗鬆症、変形性脊椎症、脊柱靭帯骨化症、肺気腫、糖尿病、腎不全との相関を case-control association study によってのみならず、internal association study (個々の疾患の中での SNPs と重症度との関係)についても解析し、疾患の発症・進展に直接関与している SNPs の特定を目指した。また、両人種に共通に同定されたプロモーター領域の遺伝子多型を示す配列には転写因子の結合が示唆されており、多型により結合能に差異が生じることから、変異による転写制御の変化の有無について検討した。

(3) 標準的なマウス近交系統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によって、Epistatic interaction が観察されるかどうかを解析し、二つの遺伝子間に Synergistic な相互作用が存在するかを解析した。Epistatic interaction の解析は、多因子病の遺伝解析の鍵となると考えられており、*Klotho* 変異の解析を通して多因子疾患の遺伝子素因を解析するシステムを確立する。

(4) 老化のような複雑な統合的現象を解析するためには、個体レベルの遺伝子機能を詳細に解析する方法の確立が必須であり、個体レベルで遺伝子機能を改変する新たな方法の確立を試み

た。

結論

(1) 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 の発現が顕著に亢進しており、結果として血清の活性型ビタミンD濃度が上昇し、血清カルシウム、リンが上昇している。1 α -hydroxylase 遺伝子はPTH、CTによって正に制御されており、ビタミンDによって負に制御されていると考えられてきたが、Klotho 蛋白が 1 α -hydroxylase 遺伝子の発現を負に制御するシグナル回路の新たな構成要素であることが明らかとなった。また、食餌のビタミンD前駆体の濃度を抑えることにより血清中の活性型ビタミンD、カルシウム、リン濃度を正常化すると多くの変異表現型が改善することから、血清中の活性型ビタミンD、カルシウム、リン濃度の上昇が変異表現型の重要な要因であることを確認した。

klotho 変異マウスではカルシウムに依存した蛋白分解酵素である μ Calpain の顕著な活性化と引き続く細胞膜裏打ち蛋白の分解、細胞崩壊が起こることが明らかとなった。同様の μ Calpain の活性化は野生型マウスの加齢によっても誘導される。加齢にともなって klotho 遺伝子の発現が低下しており、 μ Calpain の活性化機構の解明とその抑制に Klotho 蛋白がどのように関わっているかを解析することが次の課題となっている。

分泌蛋白を高感度に認識できる新たな抗体を分離し、細胞膜に存在する Klotho 蛋白に加えて、血清より130kdの細胞外ドメイン全体を含む分泌型 Klotho の同定に成功した。次いで、Klotho に結合する蛋白を免疫沈降し、電気泳動にて分離した。限られた明瞭なバンドが観察され、これらのバンドは Klotho 変異マウスを出発点とした免疫沈降では同定されず、特異的に Klotho に結合していることが強く示唆されている。現在、TOF-MAS 解析によりその分子構造を決定している。また、Klotho 蛋白の糖鎖切断活性を測定した結果、酵素活性があることを強く示唆する結果が得られた。酵素活性に必須である機能ドメインに変異を導入した遺伝子を構築し、トランスジェニックマウスの作成を試みている。

(2) ヒト *klotho* 遺伝子座の SNPs 解析により日本人閉経後女性においては、promoter 領域 (-395G \rightarrow A)および exon4 (1818C \rightarrow T)が BMD と有意な相関を示し、英国人においては、加齢とともにその相関は強くなり、65歳以上の高齢群では、1818C \rightarrow T SNP (p=0.010)と-395 G \rightarrow A SNP においても BMD との間に有意な相関が認められた (p=0.001)。また、G-395A は核蛋白との結合を著明に低下させることが明らかとなった。よって *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。高齢者女性における骨量は大きく3つの要素によって決定される。壮年期における最大骨量 (peak bone mass)、閉経直後のエストロゲン欠乏による急速な骨粗鬆化、そしてその後の加齢に伴う緩やかな骨粗鬆化である。骨密度との相関がマイクロサテライト多型においても SNPs においても、高齢群で強くなった事実は、*klotho* 遺伝子が主として 3 番目の加齢に伴う緩やかな骨粗鬆化を制御している可能性を示唆するものと言える。

(3) 標準的なマウス近交系統と Klotho 変異マウスとの掛け合わせでは、遺伝子背景の違いに拠る変異表現型の変化がほとんど観察されず、大部分の表現型の浸透率は 100%であると考えられて

きたが、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によって、その寿命が約2倍に延長し、更に生殖能力も回復したことから、MSM 系統には *Klotho* 変異を修飾する遺伝子が存在することが示された。Epistatic interaction の解析は、多因子病の遺伝解析の鍵となると考えられており、BalbC とMSMとのコンジェニックマウス、コンソミックマウスを利用して修飾遺伝子座の同定を試みており、多因子疾患の解析システムを確立する。

(4) 老化のような複雑な統合的現象を解析するためには、個体レベルの遺伝子機能を詳細に解析する方法の確立が必須であり、本プロジェクトでは「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」、「任意の組織や任意のタイミングで遺伝子変異を導入する方法の開発」を試みた。多種類の遺伝子変異を順次導入する方法を開発するために、ターゲット遺伝子の5'端と3'端に loxP、loxP' (変異を導入してあり、loxP とは組み替えをおこさない)を導入し、一方、ターゲット遺伝子に変異導入した遺伝子の5'端と3'端に loxP と loxP' をもつ遺伝子を構築し、この遺伝子と Cre-recombinase を導入することにより、ターゲット遺伝子に変異を順次導入することを試みている。また、スプライシングの制御を利用することにより、任意の組織や任意のタイミングでターゲット遺伝子に遺伝子変異を導入する方法の開発を進め、その開発に成功した。また、変異を誘導したマウスのみにおいて変異表現型が観察され、置換された1個のアミノ酸の機能を個体レベルで証明することができた。

3. 研究実施体制

京都大学グループ

鍋島陽一(京都大学大学院医学研究科教授)

全体の統括

個体老化に関与するゲノム機能の体系的研究の推進

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

生命維持機構の統合的理解と分子基盤、臨床応用に関する研究を展開する。

国立遺伝学研究所グループ

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. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Koh N., Fujimori T., Tamori A., Nishiguchi S., Shiomi S., Nakatani T., Sugimura K., Kishimoto T., Kuroki T., Nabeshima Y. Severely reduced expression of *Klotho* gene in human chronic renal failure kidney. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 280, 1015-1020 (2001)
- Yamashita T., Sekiya I., Kawaguchi N., Nabeshima Y., Noda M. *klotho*-deficient mice are resistant to bone loss induced by unloading due to sciatic neurectomy. *J. Endocrinology* 168 (2) 347-351,(2001)
- Uchida A., Komiya Y., Tashiro T., Yorifuji H., Kishimoto T., Nabeshima Y., Hisanaga S.

Neurofilaments of Klotho, the mutant mouse prematurely displaying symptoms resembling human aging. *J. Neurosci. Res.* 64, 364-370 (2001)

- Morishita K., Shirai A., Kubota M., Katakura Y., Nabeshima Y., Takeshige K., Kamiya T. The progression of aging in klotho mutant mice can be modified by dietary phosphorus and zinc. *J. Nutrition* 131, 3182-3188 (2001)
- 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 1alpha-hydroxylase gene. *Endocrinology* 143, 683-689 (2002)

(2) 特許出願

なし