

「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

本研究チームは2つのグループからなっており、(1) α -Klothoをモデルとして生命維持機構の統合的理解、(2) α -klotho遺伝子変異を修飾する遺伝子素因の研究、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を目的として研究を展開し、以下の結果を得た。

(1) α -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カルシウム輸送、及び、上皮小体における副甲状腺ホルモンの分泌を細胞外カルシウム濃度に依存して制御しており、同時にビタミンD合成の新たな調節回路の鍵を握る因子として機能することによってカルシウムホメオスタシスを制御している。(2) 細胞外カルシウム濃度を感知して Na^+/K^+ ATPaseの機能を制御するシグナル伝達システムが存在することを発見した。また、この仕組みに α -Klotho、TRPチャンネルが関与していることが明らかとなった。(3) α -Klotho蛋白はステロイド-グルココリダーゼ活性を有しており、生理活性ステロイドの活性化、あるいはステロイド-グルココリダーゼの α -Klothoとの結合・解離による立体構造の制御が α -Klotho蛋白の作用機構に関わっていると推定される。なお、ステロイドによる Na^+/K^+ ATPaseの分子動態の制御を示唆するデータも得られており、その分子機構の解析を始めている。(4) 日本人の骨密度低下症患者の遺伝子多型解析を行い、骨密度の減少に相関するヒト α -klotho遺伝子多型を見いだした。(5) α -Klotho変異マウスとMSMマウスを掛け合わせると、顕著に寿命が延長する個体が観察されるようになり、 α -Klotho遺伝子変異を修飾する遺伝子の存在が推定され、その分離を進めている。(6) 摂取コレステロールの上昇に伴ってコレステロールから胆汁酸を合成する律速酵素、cyp7A1が亢進し、コレステロールの胆汁酸への転換が起こり、一方、多量に合成された胆汁酸はcyp7A1の合成を抑えることによって、コレステロールホメオスタシスが制御されているが、 β -klotho遺伝子ノックアウトマウスでは、既存のコレステロール感知機構、胆汁酸によるcyp7A1の合成抑制機構に異常が見いだせず、新たな感知機構の存在が示唆されており、その異常により絶えずcyp7A1の機能亢進が起こっている。これらの事実は β -klotho遺伝子はコレステロールホメオスタシスの新たな制御因子として機能していることを示している。

2. 研究実施内容

京大・機能解析グループ

多彩な老化症状を呈する α -klotho変異マウスを樹立し、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た。次いで、生命維持機構における α -klothoファミリーの役割の解明、ヒト加齢関連疾患との連鎖解析を中心に研究を行い、以下の結果を得た。

(1) α -Klotho 発現細胞の同定とその解析

α -klotho遺伝子はカルシウムホメオスタシスの中枢である腎遠位尿細管、脳の脈絡膜、副甲状腺、心房上部のペースメーカー細胞で強く発現しており、これらの α -Klotho発現細胞ではNa⁺/K⁺ ATPaseを強く発現している。また、腎遠位尿細管ではカルシウム輸送を担うカルシウムチャンネル (EcaC1)、カルシウムの細胞内輸送を担うカルビンデインD28K、カルシウム・ナトリウム交換因体、 α -Klotho蛋白が共発現しており、この結果から腎臓の α -Klotho発現細胞はカルシウム再吸収の制御機能を担う細胞であることが強く示唆された。

(2) α -Klotho蛋白の成熟と分泌型 α -Klotho蛋白の同定

α -Klotho蛋白は120kDa, 135kDa, 130kDaの3つのタイプより成る。120kDaタイプは主にERに存在する未成熟型で糖鎖修飾を受けて135kDaの成熟型となり、細胞膜に輸送される。なお、135kDaタイプのみが細胞表面でビオチン化され、細胞膜上に存在するが、135kDaタイプは膜貫通ドメインの直上でセリンプロテアーゼによって切断され、130kDaの分泌型が血清、脳脊髄液中に分泌される。ヒト α -klotho遺伝子の解析からN端側のドメインよりなる70kDaの分泌型 α -Klotho蛋白の存在が推定されていたが、マウス、ヒト血清中には130kDaの分泌型は存在するが70kDa分泌型 α -Klotho蛋白は見いだせなかった。また、70kDa分泌型 α -Klothoを高発現するマウスを作成したが、全く機能を見いだせなかった。また、130kDaの分泌型を強く認識する抗体を作成し、サンドイッチエライザー測定系を開発したが、感度は十分ではなく、発現低下をモニターするのは厳しいと判断している。

(3) α -Klotho結合分子の同定と機能解析

抗 α -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、 α -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 α -Klotho蛋白結合分子を同定した。 α -Klotho蛋白はGRP78, カルネキシン、Na⁺/K⁺ ATPaseと結合していた。また、この結果は双方向の免疫沈降とImmuno-blot法によって確認された。

GRP78, カルネキシンはシャペロンとして120kDa α -Klotho蛋白に結合しており、その成熟、細胞内輸送の制御に関わっている。 α -Klotho蛋白はNa⁺/K⁺ ATPaseと複合体を形成し、この複合体の機能制御を介して遠位尿細管、脈絡膜細胞におけるカルシウム輸送能、並びに上皮小体における副甲状腺ホルモン (PTH) の分泌を制御しており、実際に、 α -klotho欠損マウスでは、尿へのカルシウムの漏出 (再吸収障

害)、脳脊髄液のカルシウム濃度の低下(脈絡膜の輸送能低下)、PTHの分泌制御異常が示唆されている。Na⁺/K⁺ ATPaseは細胞内外のK⁺、Na⁺のバランス制御、浸透圧を制御する極めて重要な分子であるが、遠位尿細管、脈絡膜細胞、上皮小体では高発現している。現在、その制御メカニズムを解析中であるが、細胞外のカルシウム濃度を感知してNa⁺/K⁺ ATPaseの機能を制御するシステムが存在することを発見した。この制御機構にα-Klotho蛋白が介在している。また、細胞外のカルシウム濃度を感知してPTHの分泌が制御されているが、この機構にもα-Klotho蛋白が介在しており、その分子機構解明を進めている。更に細胞外のカルシウム濃度を感知する機構にカルシウムチャンネルが関与することを示唆するデータが得られており、どのようにα-Klotho、Na⁺/K⁺ ATPaseの機能制御へとシグナルが伝えられるかを検討している。

(4) α-Klotho蛋白によるカルシウムホメオスタシスとビタミンD合成の制御

活性型ビタミンD合成の新たな調節回路が見いだされ、α-Klotho蛋白がその回路の鍵を握る因子として機能していることが明らかとなった。α-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1α-hydroxylaseの発現が顕著に亢進している。しかし、その制御因子として知られているPTH、CT、活性型ビタミンDのシグナルはα-Klotho変異マウスにおいても作動しており、新たな制御システムを想定することとなった。解析の結果、α-Klotho蛋白の欠失がその発現上昇の要因であること、Klotho蛋白が1α-hydroxylase(活性型ビタミンD合成の律速酵素)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が明らかとなった。活性型ビタミンDはカルシウムチャンネル、カルビンデインD28K、α-klotho遺伝子の発現上昇を介してカルシウム輸送の亢進をもたらす。ついで、発現上昇したα-Klotho蛋白が1α-hydroxylaseの発現を負に制御することによって活性型ビタミンD濃度を下方修正する仕組みとなっている。

ビタミンD欠乏餌により血清ビタミンD、カルシウム濃度を正常化すると多くの変異症状が消失することから、血清ビタミンD濃度の亢進が多彩な変異症状の重要な要因となっていることが示唆されていたが、klothoとVDR(ビタミンD受容体)遺伝子のダブルノックアウトでは、食餌によって血清カルシウム濃度を保持すれば、ほとんどの変異表現型が改善することが確認され、血清ビタミンD濃度の亢進の発症における重要性が確認された。また、血清ビタミンD、カルシウム濃度の亢進がμカルパインの過剰な活性化を誘導し、細胞死、組織の分解を引き起こすことを証明した。これによりビタミンDがカルシウム制御のみならず、多彩な老化症状の発症につながる多面的な生体制御機構に関与していることが明らかとなった。

(5) ヒト疾患とα-klotho遺伝子

α-klothoの発現が顕著に増加した患者がみつき、血清活性型ビタミンDの顕著な低下、血清カルシウム、リンの低下、骨形成障害、成長障害、二次的な副甲状腺肥大など多面的なカルシウム異常にもとづく症状が観察された。

ヒトα-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、 α -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。これらの事実からヒトにおいても α -Klotho蛋白はビタミンD合成を負に調節しており、カルシウムホメオスタシスの制御因子として機能していることが確認された。

(6) α -Klotho蛋白の酵素活性

α -Klotho蛋白はType 1 glycosylaseの一員であることから、 α -Klotho・Fcキメラ蛋白を培養細胞で高発現させ、酵素活性を解析したところ、 β -Glucuronidase活性を示した。基質特異性が極めて高く、 β -Glucuronidase阻害剤で阻害される。グルクロン酸をもつ分子が基質の候補と推定され、生体内分子としてはでプロテオグリカン、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り、steroid glucuronides (β -Estradiol 3- β -glucuronide, β -Estradiol 17- β -glucuronide, Androsterone glucuronide, Eticholan-3 α -ol-17-one glucuronide, Teststerone β -D glucuronide, Estrone 3- β -glucuronide, 5 β -Pregnane-3 α ,20 α -diol glucuronide, Dehydroisoandrosterone 3-glucuronide, 5 α -Androstane-3 α ,17 β -diol 17 β -D-glucuronide, Estriol 17 β - β -D-glucuronide, Estriol 16 α - β -D-glucuronide and Estriol 3 β -D-glucuronide), proteoglycan-disaccharides、intact proteoglycans (chondroitin, chondroitin sulfate, chondrosine, Keratan sulfate and heperan sulfate) を入手し、競合阻害活性により候補分子を絞り、基質候補分子を解析したところ、 β -Estradiol 3- β -D-glucuronide, Estrone 3- β -D-glucuronide, Estriol 3 β -D-glucuronideなどのステロイドホルモンにグルクロン酸が結合した分子のみが基質として作用を受けることが明らかとなった。 α -Klotho蛋白はステロイド-グルクロナドからグルクロン酸を切り取る β -グルクロナダーゼ活性を有している。生理活性ステロイドの活性化の制御、あるいはステロイドと α -Klotho蛋白の結合、解離による立体構造の変化が作用機構の本質であると推定される。

(7) β -Klotho遺伝子ノックアウトマウスの作成と解析

第2の分子である β -klotho遺伝子を同定した。脂肪細胞、肝臓、膵臓の外分泌細胞などで発現しており、ノックアウトマウスを作成した。 β -klothoノックアウトマウスはやや体重が軽い以外は特に外観的には異常がない。発現部位から脂肪、コレステロール代謝との関連を注目し、コレステロール負荷による影響を検討した。野生型では肝臓、血清中のコレステロール値が亢進し、肝臓より胆嚢に多量に排出されたコレステロールにより胆嚢にコレステロール結石が観察されるが、ノックアウトマウスでは肝臓、血清中のコレステロール値の亢進は同様におこるが、コレステロール結石が観察されない。肝臓のコレステロールを処理する代謝経路の活性化が推定され、検討したところ、コレステロールを胆汁酸へと変換する酵素遺伝子(cyp7A1)の亢進が観察された。詳細に解析した結果、これまで知られているコレステロールを胆汁酸へと変

換する制御システムだけでは観察された結果が理解できず、新たな制御系の存在が示唆された。そこで、野生型、ノックアウトマウスより初代培養肝臓細胞を調整して、コレステロール、胆汁酸に対する応答を検討したが、既存のコレステロール感知機構、胆汁酸によるcyp7A1の合成抑制機構に異常が見いだせず、新たな感知機構の存在を示唆する結果がえられ、その異常により絶えずcyp7A1の機能亢進が起こっていると推定している。これらの事実は β -klotho遺伝子はコレステロールホメオスタシスの新たな制御因子として機能していることを示している。

遺伝研グループ

突然変異表現型が異なった遺伝的背景によって変化することは、遺伝的修飾と呼ばれる。修飾遺伝子の研究は、突然変異遺伝子と遺伝的に相互作用する遺伝子の探索に有効である。 α -Klotho変異マウス（以下、オリジナル α -klothoマウス）の遺伝的背景を日本産野生マウス（モロシヌス亜種）由来のMSM系統に置き換えたマウス（以下、M. klotho系統）を作成し、遺伝的に大きな距離を有するMSM系統の遺伝的背景にある修飾遺伝子の探索を目的として研究を行ってきた。

α -Klotho表現型のMSM系統による遺伝的修飾について

MSM. Klotho系統の表現型を病理学的に解析した結果、血清中のカルシウム及びリン濃度が亢進していた。したがって、標準的実験用マウス系統の遺伝的背景におけるオリジナルKlothoマウスの中心的な病態と考えられるカルシウムホメオスタシスの異常はMSM. Klotho系統でも同様に認められた。しかし、興味深いことに、他の表現型については、オリジナルklothoマウスと大きく異なっていた。それは、特定の表現型の緩和と悪化の二つに大別される。

(1) 表現型の緩和

MSM. Klotho系統は、性成熟期まで正常個体と同様に成長し、平均寿命も標準的な実験用マウス系統の遺伝的背景上の α -Klothoマウスに比較して約30日延長する。また雌雄生殖器内には正常な形態の精子や二次卵胞が認められ、生殖器系の異常が緩和されていた。これらの特徴はオリジナル α -Klothoマウスの病態を改善する特徴と考えられる。

(2) 腎機能表現型の悪化

MSM. Klotho系統は、多飲多尿で、全身の組織への異所性石灰沈着が α -klothoマウスよりも重度であった。特に腎臓は細動脈の石灰化と共に尿細管萎縮、糸球体硬化など組織形態の異常が顕著であった。この組織所見を裏付けるように血中のBUNは異常に高値で、尿中の糖の排泄量も増加していた。これらの病態はオリジナル α -klothoマウスの病態よりも重篤であった。

以上の特徴から、MSM. klotho系統は、オリジナル α -klothoマウスよりも病態が緩やかに進行するため、老化の過程をより忠実に再現しているモデルマウスであると考えられる。また α -Klotho 遺伝子の変異による詳しい病態の進行や死因を検討する為に

も、より有力なツールとなる。特に腎臓の表現型は α -klotho遺伝子の変異により受ける障害の感受性がMSMで高い事を示している。このことは、人の腎疾患において腎不全や透析導入に至るまでの病態の進行スピードが人種により差があることと対応している。

3. 研究実施体制

機能解析グループ

京都大学大学院 医学研究科 (鍋島陽一)

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

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 (城石俊彦)

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

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

- Imura A, Iwano A., Kita N., Thoyama 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 Letters; 565 (1-3) 14-147 (2004)
- Tohyama O., Imura A., Iwano A., Jean Noel Freund, Henrissat B, Fujimori T., Nabeshima Y. Klotho is a novel-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid-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)
- Tsujikaw H., Kurotaki Y., Fujimori T., Fukuda K., Nabeshima Y.
Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system.
Molecular Endocrinology 17(12) 2393-2403 (2003)

- 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., Matssukawa 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)
- Sagai, T., Masuya, H., Tamura M., Shimizu, K., Yada, Y., Wakana S., Gondo Y., Noda, T. and Shiroishi, T. Phylogenetic conservation of a *cis*-acting regulator that controls polarized expression of Sonic hedgehog (*Shh*) in limb buds. *Mammal. Genome* 15(1) 23-34 (2004).
- Floyd, J., Gold, D., Concepcion, D., Poon, T., Wang, X., Keithley, E., Chen, D., Ward, E., Chinn, S.B., Friedman, R. A., Yu, H-T., Moriwaki, K., Shiroishi, T. and Hamilton, B. A. A natural allele of *Nxf1*/TAP suppresses retroviral insertion mutations. *Nature Genet.* 35(3) 221-228 (2003)
- Kikkawa, Y., Shitara, H., Wakana, S., Kohara, Y., Takada, T., Okamoto, M., Taya, C., Kamiya, K., Yoshikawa, Y., Tokano, H., Kitamura, K., Shimizu, K., Wakabayashi., Shiroishi, T., Kominami, R., and Yonekawa H. Mutations in a new scaffold protein Sans cause deafness in Jackson shaker mice. *Hum. Mol. Genet.* 12, 453-461, 2003.

(2) 特許出願

平成15年度特許出願件数 国内 1件 (CREST研究期間累積件数: 1件)