

## 厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）

## 総括研究報告書

## 成人病に関する遺伝子の同定と病態の解明

主任研究者 鍋島陽一（京都大学大学院医学研究科教授）

研究要旨 加齢に伴う疾患の成り立ちには遺伝子の変異や遺伝的素因が大きく関わっていることが明らかにされつつある。そこで、本研究では関連する遺伝子の同定と機能解析、及びモデル動物の作成を目的として（1）プレセニン結合蛋白、STEF1、Limkinase1などの神経疾患に関連する新たな遺伝子、sim2遺伝子、及びKlothoホモログのノックアウトマウスの作成、（2）多彩な老化症状を呈するKlothoマウスをモデルとして、発症に影響する遺伝子素因の検討、（3）カルシウム流入と神経細胞死、神経系の機能の基盤を成すシナプスネットワークの形成と機能、及びその破綻についての研究、の3点にわたる研究を行い、次の結果をえた。

（1）Limkinase1は精神障害をもたらすヒト疾患の原因遺伝子と推定されている遺伝子であることから、記憶、学習、情動に関する解析を行っているが、顕著な変化が見い出せない。sim2遺伝子のノックアウトマウスは生後に発達する褐色脂肪細胞が顕著に少なく、2、3週以内に死亡するケースが多くみられるが、この時期をクリアした個体は褐色脂肪も増加し、正常に発育することが可能となる。プレセニン結合蛋白、STEF1、Klothoホモログについては、ノックアウトマウスの作成を進めている。（2）msm系統との掛け合わせでは、多くのF1で成長障害、早期死亡がレスキューされることが明らかになり、msmマウス系統にはKlotho変異を抑える機能をもつ遺伝子が存在することが示唆された。（3）STEF遺伝子を同定し、Rho類似GTPaseの中でもRacのみに特異的なグアニンヌクレオチド変換因子であること、STEF分子は特に細胞の移動、神経突起の伸展、シナプス形成に関与していると推定された。また、活発なシナプスの可塑性が残っている海馬などでは強い発現が認められ、記憶との関連、及び、その破綻による老人性痴呆との関連が注目される。

## 分担研究者

藤森俊彦 京都大学大学院医学研究科 助手  
吉田松生 京都大学大学院医学研究科 助手  
星野幹雄 京都大学大学院医学研究科 助手

## A. 研究目的

高齢化社会を迎え、動脈硬化、糖尿病、骨粗しょう症、老人性痴呆、癌、肥満などの加齢や生活習慣に伴う疾患が増大し、国民医療費の高騰と高齢者の健康な生活を脅かしていることから成人病に対する研究の推進は急務となっている。一方、ゲノム研究の進展により遺伝子の発現や機能異常を基盤として多くの疾患が成立していること、また、疾病の発症には多数の遺伝的素因が関連していることが示唆されており、遺伝子機能を基礎として疾患を理解し、治療法や遺伝子診断などの対策をたてることの重要性が浮かび上がっている。そこで、本研究では「新たな成人病関連遺伝子の分離、同定」及び「発生工学を利用した病態解析とヒト疾患モデル動物の作製」を目的として、以下の研究を行った。

（1）特に成人病や加齢にともって発症する疾患と

の関連が推定されるアルツハイマー病遺伝子産物と結合する分子、STEF、Limkinase1、Klothoホモログ、sim2をコードする遺伝子のノックアウトマウスを作成し、病態解析に結び付けること。

（2）多因子が関与する疾患の遺伝子解析は技術的困難を抱えているが、加齢関連疾患は多数の要因によってその病態が形成されていると考えられており、発症や症状の差異をもたらす遺伝子素因の解析のためには、新たな方法論の開発を含めた取り組みが必要となっている。そこで、本計画では多彩な老化症状を示すKlotho変異マウスをモデルとして、老化関連症状の成り立ちに関与する遺伝子の探索、さらに、発症や症状の強さに関連する遺伝子素因について、新しい方法の開発を含めて検討した。

## B. 研究方法

プレセニン結合蛋白、STEF1、Klothoホモログについては、染色体遺伝子を分離し、相同組み換えベクターを作製し、ノックアウトマウスの作成を進めているところである。sim2遺伝子のノックアウトマウスは発生過程、生後の各ステップで解剖し、形

態学的な解析を行った。また、sim2はTCDDによる奇形の発生に関与することが知られていることから、共同研究により妊娠ノックアウトマウスにTCDDを投与し、その影響を観察した。Limkinase 1はヒトにおいて精神、記憶、学習などの障害に関連することが報告されていることから、水迷路テストや恐怖からの回避行動に関するテストを行った。また、本遺伝子には構造の保存されたホモログ、LimKinase 2が知られており、ノックアウトマウスを分与してもらい、ダブルノックアウトマウスを作成することとした。

Klothoマウスおよび野生型マウスの肺、脳、骨、動脈、皮膚などの臓器よりmRNAを調製し、発現が変化しているmRNAを解析した。

遺伝的背景が異なる実験室マウスとKlothoマウスを掛け合わせ、変異表現型を解析し、その差異を検討した。実験室マウスは200年以上にわたって飼育されており、癌をはじめ様々な症状を引き起こしやすい方向のバイアスがかかっており、生体の維持に関する重要な機能を失っている可能性がある。そこで、日本において、20年前に系統化され、自然マウスに近い系統であるmsmと掛け合わせ、変異表現型を解析した。

STEF分子をコードするStef遺伝子をショウジョウバエの*still life (sif)*遺伝子のマウスホモログとしてクローニングした。各ステップのマウスの中枢神経系よりmRNAを分離し、RNAプロットハイブリダイゼーション、In Situ HybridizationによりSTEF遺伝子の発現を詳細に解析した。また、STEF cDNAを発現ベクターに連結して、培養細胞に導入し、アクチン繊維の動態を観察した

### C. 研究結果

変異症状の個体差、あるいは系統差については検索個体を増やす必要があるが、B6のバックグラウンドで、やや症状が軽い傾向にあること、メスの症状がオスに比して重い傾向にあることが明らかとなった。驚いたことに、msmのバックグラウンドに移すと、成長障害、短寿命、不妊などの症状が改善することが明らかになり、msmマウスにはKlotho変異を抑える遺伝子が存在することが示唆された。さらに掛け合わせ個体を増やしたところ、Klotho変異を抑えることができない個体が現われ、この事実は抑制遺伝子をマッピングできる可能性を示唆している。また、B6バックグラウンドでmsmの特定のクローゾームをもつコンソミック系統との掛け合わせを進めており、この結果から、抑制遺伝子座を特定できるものと考えている。

生後7週のKlothoマウスとコントロールマウスよりmRNAを調製し、発現変化を調べたところ、多数

の遺伝子の発現に変化があることが示されたが、顕著な形態学的な異常を反映したものが多く含まれると推定された。現在は形態学的変化の観察されない1、2週のマウスの解析を行っている。続いて、DNAチップの利用のための予備実験を行い、体系的に発現変化を解析するシステムを立ち上げた。

プレセニリン結合蛋白遺伝子は100Kbを越えると推定される遺伝子で多数の細かいエクソンに切断されており、かつ、5'端を構成する部分が異常な程GCリッチであるために、5'端を構成する部分の染色体遺伝子の分離がきわめて困難であったことから、プレセニリンとの結合部位と想定される部分を欠失するタイプの相同組み換えベクターを作成し、相同組み換え細胞の分離、マウスの作成を進めている。STEF1, Klothoホモログについては、全長を含む染色体遺伝子を分離し、相同組み換えベクターを作製し、相同組み換え細胞を選択している。

sim2遺伝子は神経系を中心に発生過程の制御に関与することが予想されていたが、ノックアウトマウスを作成したところ、発生過程に特記すべき変異症状は観察されなかった。ところが、生後、2、3週に死亡する個体が多いことがわかり、形態学的な解析を行ったところ、脂肪組織の発達が障害されていることが判った。とりわけ、褐色脂肪細胞が存在する部位での減少が顕著であった。また、TCDDなどの奇形誘発剤による奇形の発生を検討した。

Limkinase 1はヒトにおいて精神、記憶、学習などの障害に関連することが報告されている。そこで、Limkinase 1遺伝子にlacZ遺伝子をノックインする形の相同組み換えマウスを作成し、発色をメルクマールに脳における発現を解析したところ、海馬に強い発現があること、基底核、橋に発現の強い部分があること、大脳皮質にも部分的ではあるが層状の発現があることが観察された。ついで、水迷路テストや恐怖からの回避行動に関するテストを行ったが、現時点ではコントロールとの差異は見い出されていない。Limkinase 1遺伝子には構造の保存されたホモログ、Limkinase 2が知られており、代償作用が推定されることから、Limkinase 2遺伝子のノックアウトマウスを入手し、ダブルノックアウトマウスを作成し、解析を行っている。なお、Limkinase 2ノックアウトマウスは正常に発生し、機能的にも顕著な変異が見い出されることが確認されている。

Klothoマウスの生化学的検索によりカルシウム、リン酸塩の血中、尿中濃度が顕著に高いこと、ビタミンD血中濃度はコントロールの2倍以上あること、また、成長ホルモン、テストステロンなどの濃度も顕著に高いことが明らかになり、さらに重要なことは生化学的な変化は生後から観察され、その結果として、生後3、4週に形態学的な変化が現われると

考えられ、変異症状の階層性を解析する手段が得られた。また、ホルモンやビタミンなどの生体の維持、制御に関わるシグナル分子の血中濃度がコントロールより高いにも関わらず、マウス個体では欠損症状が観察され、この事実はKlotho蛋白の分子機能と深く関わっていると推定された。

STEF分子は、PHドメインを2つ、PDZおよびDHドメインを1つずつ含んだ細胞内蛋白質で、SIF以外にもマウスTIAM1蛋白質とアミノ酸配列およびドメイン構成の上で高い類似性を示した。また、STEF分子はRho類似GTPaseの中でもRacのみに特異的なグアニンスクレオチド変換因子であることが明らかになった。さらに、STEF蛋白質は細胞内アクチンフィラメントの構造を変化させラフリング膜を引き起こすことも示された。Stef遺伝子は発生途上の中樞神経系の一部、特に移動中の神経細胞や神経突起を伸ばしたりシナプスを形成している時期の神経細胞で強く発現していることがわかった。成体になるとほとんどの脳組織におけるStef遺伝子の発現は微弱になるが、まだ活発なシナプスの可塑性が残っている海馬などでは強い発現が認められた。

#### D. 考察

加齢関連疾患は複雑な要因が関与しており、その解明のためには、モデル動物の作成と解析は必須である。本研究ではノックアウトマウスの作成を試み、変異症状を解析しているが、ヒトとマウスでは類似の症状が観察される一方で、異なる結果も得られている。この点をどうクリアするかが問題であるが、変異症状は異なっている、分子機構の解析により、病気の分子の分子機構解明の糸口になることが推定され、全体として病気の理解を深められるものと考えている。

掛け合わせにより、遺伝的背景の違いが多様な老化症状の発現に影響を与えることが明らかとなり、最終的にはそれぞれの老化症状の成り立ちに関連する遺伝子素因の遺伝子座を同定し、素因遺伝子を分離することができると展望している。本実験は疾患を構成する多因子素因の解析法に発展するものと期待している。

Klothoマウスにおいて、コントロールより多量のビタミンやホルモンなどのシグナル分子が血中に存在しているにもかかわらず、欠損症状を示すことは今後の研究方向を探る上で重要な知見である。

STEF分子が特に移動中の神経細胞や神経突起を伸ばしたりシナプスを形成している時期の神経細胞で強く発現していることから、細胞の移動、神経突起の伸展、シナプス形成に関与していると推定される。また、活発なシナプスの可塑性が残っている海馬などでは強い発現が認められ、記憶との関連、及

び、その破綻による老人性痴呆との関連に注目している。

#### E. 結論

多彩な老化症状を呈するKlothoマウスをモデルとして、遺伝子素因がその多彩な症状の発症にどのように影響するかを検討した。遺伝的背景により、症状が一部に軽減される傾向にあることが明らかとなった。また、msmマウス系統にはKlotho変異を抑える機能をもつ遺伝子が存在することが示唆された。第2の方法として、Klothoマウスと野性型マウスで発現変化の認められる遺伝子の分離同定を試みており、さらに体系的に検討する手段としてDNAチップシステムを導入するための基礎的検討を行った。

発生工学を利用した病態解析とヒト疾患モデル動物の作製を目的として、プレセニリン結合蛋白、STEF1、Limkinase1、sim2、及びKlothoホモログのノックアウトマウスの作成を試み、その変異表現型を解析した。Limkinase1ノックアウトは記憶、学習、情動に関する解析を行っているが、顕著な変化が見い出せない。そこで、Limkinase2ノックアウトマウスとの掛け合わせによりダブルノックアウトマウスの作成を進めている。sim2遺伝子のノックアウトマウスは生後に発達する褐色脂肪細胞が顕著に少なく、2、3週以内に死亡するケースが多くみられるが、この時期をクリアした個体は褐色脂肪も増加し、正常に発育することが可能となる。

STEF分子がRacの活性化を介してアクチン細胞骨格系の構造変化を引き起こし、神経細胞の移動や神経突起の伸長、およびシナプス形成等に関与していることが示唆された。

#### F. 研究発表

1) Yoshida N., Yoshida S., Fujisawa-Sehara A., and Nabeshima Y. Variation of MyoD and myf-5, which precedes myogenin expression and irreversible commitment, specifies the differentiating and "Reserve Cells" upon myogenesis.

J. Cell Sci. 111, 769-779 (1998)

2) Matsumura Y., Aizawa H., Shiraki-Iida T., Nagai R., Kuro-o M., Nabeshima Y.

Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted Klotho protein. Biochem. Biophys. Res. Comm. 242, 626-630 1998

3) Shiraki-Iida T., Aizawa H., Matsumura Y., Sekine S., Iida A., Anazawa H., Nagai R., Kuro-o M., Nabeshima Y. Structure of the mouse Klotho gene and its two transcripts

encoding membrane and secreted protein.

FEBS Letters 424, 6-10, 1998

4) Okuda A., Fukushima A., Nishimoto M., Orimo A., Yamagishi T., Nabeshima Y., Kuro-o M., Nabeshima Y., Boon K., Keaveney M., Stunnenberg H.G., Muramatsu M. UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells. EMBO J. 17, 2019-2032 1998

5) Kurisaki T., Masuda A., Yagami-Hiromasa T., Nabeshima Y. and Fujisawa-Sehara A. Spatially-and temporally-restricted expression of meltr in a and b in mouse embryo. Mechan. Dev. 73, 211-221 (1998)

6) Takahashi S., Esumi E., Nabeshima Y., Asashima M. Regulation of the Xmyf-5 and XmyoD expression pattern during early Xenopus development. Zoolog. Sci. 15, 231-238 (1998)

7) Saito Y., Yamagishi T., Nakamura T., Ohyama Y., Aizawa H., Suga T., Matsumura Y., Masuda H., Kurabayashi M., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nagai R. Klotho protein protects against endothelial dysfunction. Biochem. Biophys. Res. Comm. 248, 324-329 (1998)

8) Nakagoshi H., Hoshi M., Nabeshima Y., Matsuzaki F. *defective proventriculus* encodes a novel homeo-domain protein required for the functional specification in *Drosophila* midgut. Gene & Develop. in press

9) Aizawa H., Saito Y., Nakamura T., Inoue M., Imanari T., Ohyama Y., Matsumura Y., Masuda H., Oba S., Mise N., Kimura K., Hasegawa A., Kurabayashi M., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nagai R. Downregulation of the klotho gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats. Biochem. Biophys. Res. Comm. 249, 865-871 (1998)

10) Ohyama Y., Kurabayashi M., Masuda H., Nakamura T., Aihara Y., Kaname T., Suga T., Arai M., Aizawa H., Matsumura Y., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nagai R. Molecular cloning of Rat klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress. Biochem. Biophys. Res. Comm. in press

11) Yamashita T., Nifuji A., Furuya K., Nabeshima Y., Noda M. Elongation of the

epiphyseal trabecular bone in transgenic mice carrying a klotho gene locus mutation that leads to a syndrome resembling aging. J.

Endocrinology 159, 1-8 (1998)

12) Hoshino M., Suzuki E., Miyake T., Sone M., Komatsu A., Nabeshima Y., Hama C. Neural expression of Hikaru genki protein during embryonic and larval development of *Drosophila melanogaster*. Development Genes and Evolution in press

13) Kameya S., Miyagoe-Y., Nonaka I., Ikemoto T., Endo M., Honoka K., Nabeshima Y., Takeda S.,  $\alpha 1$ -Syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric-oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration. J. Biol. Chem. 274, 2193-2200 (1999)

G. 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告書

発生工学による加齢疾患モデルの作成と解析

分担研究者 藤 森 俊 彦（京都大学大学院医学研究科助手）

研究要旨 動脈硬化、糖尿病、骨粗しょう症、老人性痴呆、癌、肥満などの加齢に伴う疾患の成り立ちには遺伝子の変異や遺伝的素因が大きく関わっていることが明らかにされつつあるが、研究の飛躍的な進歩のためには、さらに多くの関連遺伝子の同定と機能解析を必要としている。そこで、本研究では発生工学を利用した病態解析とヒト疾患モデル動物の作製を目的として、プレセニン結合蛋白、STEF1、Limkinase1などの神経疾患に関連する新たな遺伝子、sim2遺伝子、及びKlothoホモログのノックアウトマウスの作成を試みている。Limkinase1は精神障害をもたらすヒト疾患の原因遺伝子と推定されている遺伝子であることから、記憶、学習、情動に関する解析を行っているが、顕著な変化が見い出せない。そこで、Limkinase2ノックアウトマウスとの掛け合わせによりダブルノックアウトマウスの作成を進めている。sim2遺伝子のノックアウトマウスは生後に発達する褐色脂肪細胞が顕著に少なく、2、3週以内に死亡するケースが多くみられるが、この時期をクリアした個体は褐色脂肪も増加し、正常に発育することが可能となる。プレセニン結合蛋白、STEF1、Klothoホモログについては、染色体遺伝子を分離し、相同組み換えベクターを作製し、ノックアウトマウスの作成を進めているところである。

A. 研究目的

発生工学技術の進歩により対象とする遺伝子を欠失したマウスや異所性に発現するマウスを作製することにより遺伝子機能の解析、変異表現型の解析が可能となり、人為的に疾患モデル動物を作製することが可能となっている。本研究では特に成人病や加齢にともって発症する疾患との関連が推定される遺伝子を個体レベルで操作することにより、病態解析、疾患モデルとしての評価、臨床研究への応用を図ることとした。具体的には以下の4点にわたる研究を目的として実験を行った。

(1) アルツハイマー病遺伝子産物と結合する分子、シナプス機能に関連する分子、大脳の形成を介して神経疾患に関連すると推定される分子をコードする遺伝子についてノックアウトマウス、異所性に発現するマウスを作製する。(2) 精神障害をもたらすヒト疾患の原因遺伝子と推定されている遺伝子Limkinase1をノックアウトしたマウスの記憶、学習、情動に関する解析(3) 脂肪細胞数の減少を示すノックアウトマウスの作製に成功しており、詳細な解析を行う。(4) 新たに見つかったKlothoホモログのノックアウトマウスの作製。

B. 研究方法

sim2遺伝子のノックアウトマウスは発生過程、生後の各ステップで解剖し、形態学的な解析を行った。また、sim2はTCDDによる奇形の発生に関与することが知られていることから、共同研究により妊娠ノ

ックアウトマウスにTCDDを投与し、その影響を観察した。Limkinase1はヒトにおいて精神、記憶、学習などの障害に関連することが報告されていることから、水迷路テストや恐怖からの回避行動に関するテストを行った。また、本遺伝子には構造の保存されたホモログ、Limkinase2が知られており、ノックアウトマウスを分与してもらい、ダブルノックアウトマウスを作成することとした。

プレセニン結合蛋白、STEF1、Klothoホモログについては、染色体遺伝子を分離し、相同組み換えベクターを作製し、ノックアウトマウスの作成を進めているところである。

C. 研究結果

sim2遺伝子は神経系を中心に発生過程の制御に関与することが予想されていたが、ノックアウトマウスを作成したところ、発生過程に特記すべき変異症状は観察されなかった。ところが、生後、2、3週に死亡する個体が多いことがわかり、形態学的な解析を行ったところ、脂肪組織の発達が障害されていることが判った。とりわけ、褐色脂肪細胞が存在する部位での減少が顕著であった。また、TCDDなどの奇形誘発剤による奇形の発生を検討した。

Limkinase1はヒトにおいて精神、記憶、学習などの障害に関連することが報告されている。そこで、Limkinase1遺伝子にlacZ遺伝子をノックインする形の相同組み換えマウスを作成し、発色をメルクマールに脳における発現を解析したところ、海馬に強い

発現があること、基底核、橋に発現の強い部分があること、大脳皮質にも部分的ではあるが層状の発現があることが観察された。ついで、水迷路テストや恐怖からの回避行動に関するテストを行ったが、現時点ではコントロールとの差異は見い出されていない。Limkinase 1遺伝子には構造の保存されたホモログ、Limkinase 2が知られており、代償作用が推定されることから、Limkinase 2遺伝子のノックアウトマウスを入手し、ダブルノックアウトマウスを作成し、解析を行っている。なお、Limkinase 2ノックアウトマウスは正常に発生し、機能的にも顕著な変異が見い出されることが確認されている。

プレセニリン結合蛋白遺伝子は100Kbを越えると推定される遺伝子で多数の細かいエクソンに分断されており、かつ、5'端を構成する部分が異常な程GCリッチであるために、5'端を構成する部分の染色体遺伝子の分離がきわめて困難であったことから、プレセニリンとの結合部位と想定される部分を欠失するタイプの相同組み換えベクターを作成し、相同組み換え細胞の分離、マウスの作成を進めている。STEF1, Klothoホモログについては、全長を含む染色体遺伝子を分離し、相同組み換えベクターを作製し、相同組み換え細胞を選択している。

#### D. 考察

加齢関連疾患は複雑な要因が関与しており、その解明のためには、モデル動物の作成と解析は必須である。本研究ではいくつかの遺伝子を対象にノックアウトマウスの作成を試み、変異症状を解析しているが、ヒトとマウスでは類似の症状が観察される一方で、異なる結果も得られている。モデルマウスを作成と解析にあたっては、この点をどうクリアするかが問題であるが、変異症状は異なっても、遺伝子変異マウスで起こっている事柄の分子メカニズムの解析により、病気の分子の分子機構解明の糸口になることが推定され、多数の関連遺伝子を操作することにより、全体として病気の理解を深められるものと考えている。

#### E. 結論

加齢関連疾患研究の飛躍的な進歩のためには、多くの関連遺伝子の同定と機能解析を必要としている。本研究では発生工学を利用した病態解析とヒト疾患モデル動物の作製を目的として、プレセニリン結合蛋白、STEF1, Limkinase1などの神経疾患に関連する新たな遺伝子、sim2遺伝子、及びKlothoホモログのノックアウトマウスの作成を試み、その変異表現型を解析した。Limkinase1ノックアウトは記憶、学習、情動に関する解析を行っているが、顕著な変化が見い出せない。そこで、Limkinase2ノックアウトマウスとの掛け合わせによりダブルノックアウトマウスの作成を進めている。sim2遺伝子のノックア

ウトマウスは生後に発達する褐色脂肪細胞が顕著に少なく、2、3週以内に死亡するケースが多くみられるが、この時期をクリアした個体は褐色脂肪も増加し、正常に発育することが可能となる。プレセニリン結合蛋白、STEF1, Klothoホモログについては、染色体遺伝子を分離し、相同組み換えベクターを作製し、ノックアウトマウスの作成を進めているところである。

#### F. 研究発表

現在、作成中

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告書

早期老化マウスKlothoの発症に影響を与える遺伝子素因の研究

分担研究者 吉田松生（京都大学大学院医学研究科助手）

研究要旨 動脈硬化、糖尿病、骨粗しょう症、老人性痴呆、癌、肥満などの加齢に伴う疾患の成り立ちには遺伝子の変異や遺伝的素因が大きく関わっていることが明らかにされつつある。そこで、本研究では多彩な老化症状を呈するKlothoマウスをモデルとして、遺伝子素因がその多彩な症状の発症にどのように影響するかを検討した。解析は成長速度、寿命、生殖器官の発達、カルシウム代謝、血中ホルモン濃度など数値化しやすいものを対象とした。遺伝的背景の異なる実験マウス2系統（いずれもヨーロッパのマウス）とKlothoマウスとmsm系統（日本のマウス）を掛け合わせたものを解析したところ、実験マウス系統では、ほぼ同様の症状をもつが、オスがメスに比べて症状が軽い傾向があること、B6マウス系統に掛け合わせると、症状が一部に軽減される傾向にあること、また、msmとの掛け合わせでは、多くのF1で成長障害、早期死亡がレスキューされることが明らかになり、msmマウス系統にはKlotho変異を抑える機能をもつ遺伝子が存在することが示唆された。第2の方法として、Klothoマウスと野生型マウスで発現変化の認められる遺伝子の分離同定を試みており、さらに体系的に検討する手段としてDNAチップシステムを導入するための基礎的検討を行った。

A. 研究目的

単一遺伝子の変異や発現の異常によってもたらされる疾患については、その原因遺伝子の解明が急速に進められているが、多因子が関与する疾患の遺伝子解析については技術的な困難により、解析が遅れている。現在の知見によれば、加齢関連疾患の多くは多数の要因によってその病態が形成されていると考えられており、発症や症状の差異をもたらす遺伝子素因の解析のためには、新たな方法論の開発を含めた取り組みが必要となっている。

そこで、本計画では多彩な老化症状を示すKlotho変異マウスをモデルとして、老化関連症状の成り立ちに関与する遺伝子の探索、さらに、発症や症状の強さに関連する遺伝子素因について、新しい方法の開発を含めて検討することとした。

本計画は多因子が関連する疾患の遺伝子素因を解析する方法の確立を目指したトライアルとして位置づけられており、遺伝子同定に至るには長期的な実験の第一歩となるものである。

B. 研究方法

解析のためには、数値化しやすい指標を選択する必要があることから、対象として、体重増加、寿命、生殖能力、ホルモン、ビタミンの血中濃度、カルシウム、リンなどの血中、尿中濃度などを選択し、まず、Klotho変異マウスにおけるこれらの値を詳細に調べた。

Klotho変異によって発現が著しく変化して

いる遺伝子を同定し、新たな疾患関連遺伝子を分離すると共に、病態成立における役割を解明する。Klothoマウスおよび野生型マウスの肺、脳、骨、動脈、皮膚などの臓器よりmRNAを調製し、発現が変化しているmRNAを解析した。

遺伝的背景が異なる実験室マウスとKlothoマウスを掛け合わせ、変異表現型を解析し、その差異を検討した。実験室マウス全て、ヨーロッパ由来であり、既に200年以上にわたって飼育されており、癌をはじめ様々な症状を引き起こしやすい方向のバイアスがかかっており、生体の維持に関する重要な機能を失っている可能性がある。そこで、日本において、20年前に系統化され、自然マウスに近い系統であるmsmと掛け合わせ、変異表現型を解析した。

C. 研究結果

Klothoマウスの生化学的検索によりカルシウム、リン酸塩の血中、尿中濃度が顕著に高いこと、ビタミンD血中濃度はコントロールの2倍以上あること、また、成長ホルモン、テストステロンなどの濃度も顕著に高いことが明らかになり、さらに重要なことは生化学的な変化は生後から観察され、その結果として、生後3、4週に形態学的な変化が現われると考えられ、変異症状の階層性を解析する手段が得られた。また、ホルモンやビタミンなどの生体の維持、制御に関わるシグナル分子の血中濃度がコントロールより高いにも関わらず、マウス個体では欠損症状が観察され、この事実はKlotho蛋白の分子機能と深

く関わっていると推定された。

変異症状の個体差、あるいは系統差については検索個体を増やす必要があるが、B6のバックグラウンドで、やや症状が軽い傾向にあること、メスの症状がオスに比して重い傾向にあることが明らかとなった。驚いたことに、msmのバックグラウンドに移すと、成長障害、短寿命、不妊などの症状が改善することが明らかになり、msmマウスにはKlotho変異を抑える遺伝子が存在することが示唆された。さらに掛け合わせ個体を増やしたところ、Klotho変異を抑えることができない個体が現われ、この事実は抑制遺伝子をマッピングできる可能性を示唆している。また、B6バックグラウンドでmsmの特定のクロモゾームをもつコンソミック系統との掛け合わせを進めており、この結果から、抑制遺伝子座を特定できるものと考えている。

生後7週のKlothoマウスとコントロールマウスよりmRNAを調製し、発現変化を調べたところ、多数の遺伝子の発現に変化があることが示されたが、顕著な形態学的な異常を反映したものが多く含まれると推定された。現在は形態学的変化の観察されない1、2週のマウスの解析を行っている。続いて、DNAチップの利用のための予備実験を行い、体系的に発現変化を解析するシステムを立ち上げた。

#### D. 考察

掛け合わせにより、遺伝的背景の違いが多様な老化症状の発現に影響を与えることが明らかとなり、最終的にはそれぞれの老化症状の成り立ちに関連する遺伝子素因の遺伝子座を同定し、素因遺伝子を分離することができると展望している。本実験は疾患を構成する多因子素因の解析法に発展するものと期待している。

コントロールより多量のビタミンやホルモンなどのシグナル分子が血中に存在しているにもかかわらず、欠損症状を示すことは今後の研究方向を探る上で重要な知見である。

#### E. 結論

多彩な老化症状を呈するKlothoマウスをモデルとして、遺伝子素因がその多彩な症状の発症にどのように影響するかを検討した。実験マウス系統では、ほぼ同様の症状をもつが、オスがメスに比べて症状が軽い傾向があること、B6マウス系統に掛け合わせると、症状が一部に軽減される傾向にあることが明らかとなった。また、msmとの掛け合わせでは、多くのF1で成長障害、早期死亡、不妊がレスキューされることが明らかになり、msmマウス系統にはKlotho変異を抑える機能をもつ遺伝子が存在することが示唆された。第2の方法として、Klothoマウスと野性型マウスで発現変化の認められる遺伝子の分離同定を試みており、さらに体系的に検討する手段

としてDNAチップシステムを導入するための基礎的検討を行った。

#### F. 研究発表

Yoshida N, Yoshida S., Fujisawa-Sehara A., and Nabeshima Y. Variation of MyoD and myf-5, which precedes myogenin expression and irreversible commitment, specifies the differentiating and "Reserve Cells" upon myogenesis.

J. Cell Sci. 111, 769-779 (1998)

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告書

老人性痴呆の基盤となるシナプスの形成と機能に関する研究

分担研究者 星野 幹雄（京都大学大学院医学研究科助手）

研究要旨 痴呆の病態解明の基盤となる研究一環として、カルシウムと神経細胞死、神経系の機能の基盤を成すシナプスネットワークの形成と機能、及びその破綻について研究を行っており、本報告ではネットワーク形成機構を中心に報告する。

ネットワークの形成の基盤となる神経突起の伸展や移動などはアクチン細胞骨格系による制御が関与していると考えられており、本研究では神経回路網形成におけるアクチン細胞骨格系の制御に関わる分子として、STEF遺伝子を同定し、その性質を解析した。STEFは、PHドメインを2つ、PDZおよびDHドメインを1つずつ含んだ細胞内蛋白質で、SIF以外にもマウスTIAM1蛋白質とアミノ酸配列およびドメイン構成の上で高い類似性を示した。またin vitroにおけるグアニンヌクレオチド交換因子活性実験を行ったところ、STEF分子はRho類似GTPaseの中でもRacのみに特異的なグアニンヌクレオチド交換因子であることが明らかになった。STEF分子は特に移動中の神経細胞や神経突起を伸ばしたりシナプスを形成している時期の神経細胞で強く発現していることから、細胞の移動、神経突起の伸展、シナプス形成に関与していると推定される。また、活発なシナプスの可塑性が残っている海馬などでは強い発現が認められ、記憶との関連、及び、その破綻による老人性痴呆との関連が注目される。

A. 研究目的

長寿社会を迎え、加齢にともなって発症する疾患の病態を解明し、その治療法を開発することが急務となっている。とりわけ、老人性痴呆、アルツハイマー病に代表される中枢神経系の疾患に関する研究の飛躍的な発展が望まれている。

本研究課題ではアルツハイマー病に関連する遺伝子の解析と共に、痴呆の病態解明の基盤となる研究を推進することを目的としており、その一環として、カルシウムと神経細胞死、神経系の機能の基盤を成すシナプスネットワークの形成と機能、及びその破綻について研究を行っており、本報告ではネットワーク形成機構を中心に報告する。ネットワークの形成は軸索の伸長、ターゲットの認識、シナプスの形成など、複雑なステップよりなっている。これらのステップは軸索の伸長を誘導、あるいは阻害する因子や接着分子など、多数の因子によって制御されている。これらの複雑な現象の基盤となる神経突起の伸展や移動などはアクチン細胞骨格系による制御が関与していると考えられており、本研究では神経回路網形成におけるアクチン細胞骨格系の役割を解析することによって、神経ネットワーク形成の分子機構を解明することとした。

B. 研究方法

一般にアクチン細胞骨格系を制御する機構としては、Rho類似GTPaseの細胞内カスケードが良く知ら

れているが、そのファミリーの一員であるRacを活性化する新規グアニンヌクレオチド交換因子STEFを同定した。

STEF分子をコードするStef遺伝子はショウジョウバエの*still life (sif)*遺伝子のマウスホモログとしてクローニングした。*sif*は行動異常を示すショウジョウバエの突然変異体から我々が同定した遺伝子であり、複数のドメイン構造を持つRho類似GTPase活性化因子をコードしている。このSIF蛋白質は神経系のシナプス末端内の細胞膜近傍に局在し、またこの蛋白質を神経系で強制発現させるとシナプスの形成に異常をきたすことから、SIF蛋白質はRho類似GTPaseの活性化を介してアクチン細胞骨格系の制御を行い、ショウジョウバエのシナプスの発生や形態変化に関与していることが示唆された(Science, 1997)。

各ステップのマウスの中枢神経系よりmRNAを分離し、RNAプロットハイブリダイゼーション、In Situ HybridizationによりSTEF遺伝子の発現を詳細に解析した。また、STEF cDNAを発現ベクターに連結して、培養細胞に導入し、アクチン繊維の動態を観察した。

C. 研究結果

STEF分子が発生途上の中枢神経系で発現すること、そのショウジョウバエ相同蛋白質がシナプス形成に関与していることなどから、この分子が神経回

路網の形成に重要な役割を果たしているのではないかと考えており、この分子の機能解析を目的として実験を行い、以下の結果を得た。

塩基配列から予想されるSTEFの構造は、PHドメインを2つ、PDZおよびDHドメインを1つずつ含んだ細胞内蛋白質で、SIF以外にもマウスTIAM1蛋白質とアミノ酸配列およびドメイン構成の上で高い類似性を示した。またin vitroにおけるグアニンヌクレオチド変換因子活性実験を行ったところ、STEF分子はRho類似GTPaseの中でもRacのみに特異的なグアニンヌクレオチド変換因子であることが明らかになった。さらにKBやNIH3T3などの培養細胞を用いた実験系において、STEF蛋白質は細胞内アクチンフィラメントの構造を変化させラフリング膜を引き起こすことも示された。in situハイブリダイゼーションの結果から、*Stef*遺伝子は発生途上の中枢神経系の一部、特に移動中の神経細胞や神経突起を伸ばしたりシナプスを形成している時期の神経細胞で強く発現していることがわかった。成体になるとほとんどの脳組織における*Stef*遺伝子の発現は微弱になるが、まだ活発なシナプスの可塑性が残っている海馬などでは強い発現が認められた。

#### D. 考察

STEF分子が特に移動中の神経細胞や神経突起を伸ばしたりシナプスを形成している時期の神経細胞で強く発現していることから、細胞の移動、神経突起の伸展、シナプス形成に関与していると推定される。また、活発なシナプスの可塑性が残っている海馬などでは強い発現が認められ、記憶との関連、及び、その破綻による老人性痴呆との関連に注目している。

#### E. 結論

STEF分子がRacの活性化を介してアクチン細胞骨格系の構造変化を引き起こし、神経細胞の移動や神経突起の伸長、およびシナプス形成等に関与していることが示唆された。

#### F. 研究発表

1) Hoshino M., Suzuki E., Miyake T., Sone M., Komatsu A., Nabeshima Y., Hama C.  
Neural expression of Hikaru genki protein during embryonic and larval development of *Drosophila melanogaster*. *Development Genes and Evolution* in press

2) Hoshino M. Sone M., Kaibuchi K. Nabeshima Y., and Hama C.  
Isolation of STEF, a homolog of *sif* and *tiam 1* and its GDP-GTP exchanger activity.

J. Biol. Chem. in press

#### G. 知的所有権の取得状況

なし