

19990338

厚生科学研究費補助金  
ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業

老化疾患モデルマウスを用いた成人病に関連  
する遺伝子の同定と病態の解明

(H10-ゲノム-011)

平成11年度研究報告書

平成12年3月

主任研究者 鍋 島 陽 一

総括研究報告書

老化疾患モデルマウスを用いた成人病に関連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生活習慣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）プレセニリン結合蛋白、STEF1, *Limkinase1,2*のダブルノックアウトなどの神経疾患に関連する新たな遺伝子、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）リンの摂取と変異表現型の関係、（4）*klotho*遺伝子の多型とリンクする疾患の4点にわたる研究を行い、次の結果をえた。*Limkinase1*欠損マウスは、全く変異が同定できないことから、*Limkinase2*とのダブルノックアウトマウスの作成したが、現時点では全く変異を見い出すことができない。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、相同組み換えES細胞を分離し、ノックアウトマウスの作成を進めているところである。特にプレセニリン結合蛋白の強制発現は神経細胞死を抑制し、アルツハイマー脳では発現が著しく減少していることが明かとなり、神経細胞死を抑えるために重要な機能を担っていると推定されている。*klotho*遺伝子座に*lacZ*をノックインしたマウスの解析により詳細な発現細胞の同定、*null*変異の変異表現型を確認した。血中、尿中にリンの濃度が顕著に高いことから、リンの摂取量を食餌により制御したところ、オスにおいて変異表現型の回復が観察された。また、メスにおいては、リンの摂取制限と亜鉛の添加により*klotho*の発現なしに変異症状が回復することが明らかとなった。また、リンの摂取量が*klotho*の発現に影響することが明らかになった。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。掛け合わせにより、遺伝的背景の違いが多彩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道が開かれた。*klotho*遺伝子の多型が代謝性疾患とリンクすることが明らかとなった。

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「発牛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、*Limkinase1,2* *Klotho*ホモログ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、

加、寿命の延長、生殖能力の回復など、様々な症状が改善することが観察された。また、これらのマウスではklotho遺伝子の発現が野生型の3分の1程度まで回復していることが明らかになった。さらに野生型マウスにおいても、食餌中のリンの濃度を制限するとklotho遺伝子の発現が上昇し、過剰に摂取するとklothoの発現が低下することが明らかとなった。野生型マウスの場合はリンの摂取量を変えても、血液中のリンの濃度の変化はわずかであり、正常値を示していることから、影響がないようにみえるが、これは生体の恒常性維持機構の結果であって、そのために生体では多くの変化が起こっていることを示している。次にメスにおいてはリンの摂取制限の効果が現われないが、驚いたことにメスではリンの摂取量を制限してもklotho遺伝子の発現上昇がほとんどないことが明らかとなった。そこで、メスにおいても変異表現型が回復する条件を検討したところ、リンの摂取制限に加えてオロト酸亜鉛を食餌に添加すると良いことがわかった。しかも、この場合はklotho遺伝子の発現はほとんど回復していないことも明らかとなった。

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た。一方、msmとの掛け合わせによりklothoマウスでは観察されない症状が現われることが明らかとなった。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おり、また、B6バックグラウンドでmsmの特定のク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。

KlothoマウスとコントロールマウスよりmRNAを調製し、DNAアレイにより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。それらの中からklothoマウスの変異症状と関連する一連の遺伝子群を導き出すことを試みたところ、腎臓における再吸収に関連する遺伝子が浮かび上がってきている。

遺伝子多型を調べる目的で2000組の双子児の遺伝子配列を調べ、疾病との関連を解析したところ、klotho遺伝子には7箇所遺伝子多型があることが明らかになった。これらのうち、2箇所はアミノ酸の変異を伴っており、5箇所の多型は骨密度の低下な

どの代謝性疾患とリンクすることが明らかとなった。

マウス脳よりRT-PCR法を用いて、sif遺伝子のマウスホモログstefをクローニングした。STEF蛋白質はSIFと良く似たアミノ酸配列からなり、2つのPHドメインと1つのPDZドメインおよびグアニンヌクレオチド交換因子(DH)ドメインを含んだ細胞内蛋白質であることが予想された。

stef遺伝子は特に中枢神経系において強く発現している。また、各発生段階ではstef遺伝子はマウス脳の一部の領域でのみ発現していた。将来大脳皮質になる領域、特にpostmitoticになって移動しているintermediate zoneの神経細胞や、移動を終えて、神経突起伸長やシナプス形成の段階にあると考えられるcortical plateの神経細胞で強い発現が認められた。成体では海馬のdentate gyrusやolfactory bulb、およびlateral migratory pathwayの神経細胞などの成体になっても発生途上の神経細胞が多く含まれていることが知られている領域で発現していた。

STEFはDHドメインを含んでおり、Rac1に対してはGEF活性を持っているが、その他のCdc42やRhoAに対しては活性を持たない。また、ラップリング膜を誘導することが観察され、STEF自身もラップリング膜を形成している領域に共局在する。この現象は、Rac1のドミナントネガティブ体を共発現させると抑制されたことから、STEFはRac1特異的な活性化因子として作用し、アクチン細胞骨格系を変化させるということが明らかになった。

STEF蛋白質が細胞膜領域に局在するためにはN末端側の一部の領域(PHnTSSドメイン)が必要であり、またラップリング膜形成のためにはさらにDHドメインが必要である。また、PHnTSSドメイン単独では、活性型STEFのドミナントネガティブ体として作用する。

血清存在下でN1E115神経芽細胞腫細胞株細胞にSTEFを強制発現させると、分岐の多い神経突起様構造が誘導された。これらの構造はGAP43、チューブリンなどの神経突起のマーカーでも染色された。また、内在性のSTEFの活性をドミナントネガティブ体(PHnTSS)の強制発現によって阻害すると、この細胞の血清非存在下における神経突起伸長が阻害された。以上から、STEFはN1E115細胞の神経突起伸長に関与していることが明らかになった。

#### 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。プロジェクトの途中で研究室を移転したために改めて至適条件等の検討を行ったことから、進展が遅れたが、全ての体制が整い、研究が進みはじめて

新しい方法の開発を含めて検討した。

## B. 研究方法

klotho遺伝子のエクソン1のATGコドンの下流にlaxZ, Neo遺伝子を挿入した組み換えベクターを作成し、相同組み換えES細胞を分離し、ノックインマウスを作成した。このマウスはklotho遺伝子のnull変異でもあるので、変異表現型の解析とlaxZ遺伝子の発現の両方を解析した。

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が、変異が確認できなかったことから、構造の保存されたホモログ, LimKinase 2とのダブルノックアウトマウスを作成し、発生、脳の形態、機能にちて解析した。

プレセニリン結合蛋白、STEF1, Klothoホモログ( $\beta$ -klotho)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、相同組み換え細胞を分離し、ノックアウトマウスの作成を進めている。

カルシウム、リンの血中、尿中濃度が顕著に上昇しており、食餌制限によりこれらの濃度を制御することを試みた。また、Klotho変異マウスにおいてこれに関連する遺伝子の発現変化があるか、さらに関連する遺伝子を網羅的に解析するために、Klothoマウスおよび野生型マウスの腎臓よりmRNAを調製し、DNAアレイを利用して発現が変化しているmRNAを解析した。

発症の遺伝子素因を解析する目的で、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。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。

klotho遺伝子の遺伝子多型を調べ、リンクする疾患や症状を解析した。

マウス脳よりRT-PCR法を用いて、*sif*遺伝子のマウスホモログ*stef*をクローニングした。in situ ハイブリダイゼーションにより、各発生段階の中樞神経系における発現様式を調べた。STEFがどのG蛋白質のGEFとなっているのかをin vitroの生化学的アッセイで調べた。同時にラフリング膜形成の誘導を観察した。Rac1のドミナントネガティブ体の共発現により上記現象の抑制を観察した。いろいろなドメインを欠失したSTEF蛋白質をKB細胞に強制発現させ、STEF蛋白質が細胞膜領域への局在、ラフリング膜形成を観察した。STEF、あるいはドミナントネガティブ体(PHnTSS)を強制発現し、神経突起伸長を観察した。

## C. 研究結果

klotho遺伝子座にlacZをノックインしたマウスの

ホモの変異表現型は基本的には最初に分離したTA 20 (severe hypomorph)と同様であったが、少数ではあるが精子が形成されている。しかし、この精子の運動能が低く、不妊であることは変わらない。

発生過程を含めて、ノックインマウス個体を $\beta$ ガラクトシダーゼ染色をし、発現細胞を詳細に解析したところ、これまでに確認されていた発現細胞に加えて、脳の神経細胞核、下垂体、脾臓、副甲状腺などで発現することが明かとなった。さらにこの発現を指標に発現細胞をソーティングすることが可能となり、新たな展開を迎えている。

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したマウスの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。しかし、このノックアウトマウスの行動からはコントロールとな差異が見出せず、Limkinase 1, Limkinase 2遺伝子のダブルノックアウトマウスを作成し、解析を行ったが、現時点では組織学的にも行動解析でも異常が見い出されていない。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ることから、当面、全構造を明らかにすることをやめ、相同組み換え用のベクターの作成に必要な遺伝子構造の解析を行い、Neo, GT-A遺伝子を用いて組み換えベクターを作成した。500個を超える細胞を解析したが、相同組み換えクローンが得られておらず、さらに500個の解析を続行中である。さらに昨年報告された新しい方法であるRNAiを用いた機能欠損マウス作成を試みている。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、組み換え細胞を用いてマウス個体を作成中である。

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、アルド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た。そこで、食餌中のリンの濃度を制限したところ、オスにおいて、体重増

いる。昨年来、新しい個体レベルの遺伝子機能解析法が話題になっているが、我々も、新たな方法の確立に着手しており、新しい方法が確立されれば、遙かに詳細な解析を短時間で行うことができるようになると期待している。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いるにもかかわらず、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。

リンの摂取量がklothoの発現に影響することが明らかになったこと、亜鉛の添加によりklothoの発現なしに変異症状が回復することが明らかとなったことは重要である。

掛け合わせにより、遺伝的背景の違いが多彩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道が開かれた。疾患を構成する多因子素因を如何に解析するかについては試行錯誤の段階にあり、解析法の発展に寄与するものと期待している。

klotho遺伝子の多型が代謝性疾患とリンクすることが明らかとなったが、将来は遺伝子診断の問題が浮上するものと思われ、その取り扱いには慎重を期さねばならない。

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

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、klotho遺伝子座にlaxZ遺伝子をノックインしたマウス、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、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。klotho遺伝子座にlaxZ遺伝子をノックインしたマウスの解析によりklotho遺伝子の詳細な発現細胞が明らかになり、同時にnull変異の変異表現型を確認した。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を作成したが、脳の形態、機能の異常が観察されていない。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。新たな方法の開発を試みており、任意の時期より遺伝子機能を改変する方法が確立されつつある。

血中、尿中にリンの濃度が顕著に高いことから、リンの摂取量を食餌により制御したところ、オスにおいて変異表現型の回復が観察された。また、メスにおいては、リンの摂取制限と亜鉛の添加によりklothoの発現なしに変異症状が回復することが明らかとなった。また、リンの摂取量がklothoの発現に影響することが明らかになった。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。掛け合わせにより、遺伝的背景の違いが多彩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道が開かれた。klotho遺伝子の多型が代謝性疾患とリンクすることが明らかとなった。

STEFが発生途上の神経系において、神経細胞移動や神経突起伸長、あるいはシナプス形成といった動的な過程で何らかの役割を果たしているらしいことが予想されてきている。恐らく、細胞外からの様々なシグナルにตอบสนองし、神経細胞内の局所でRac1を活性化させることによって、アクチン細胞骨格系の適切な変化を引き起こしているであろう。

機能ドメインが明らかになり、それを用いたtwo hybridシステムにより結合する分子の同定を進めており、それらを含めてさらにSTEFの機能について明らかにしていく。

#### 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* 209,1-9 (1999)
- 2) Kameya S., Miyagoe-Y., Nonaka I., Ikemoto T., Endo M., Honaoka 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)
- 3) Ishi A., Hagiwara Y., Saito Y., Yamamoto K., Yuasa K., Sato Y., Arahata K., Shoji S.,

Nonaka I., Saito I., Nabeshima Y., Takeda S.  
Effective adenovirus mediated gene expression in  
adult murine skeletal muscle. *Muscle & Nerve*  
22, 592-599, (1999)

4) Hoshino M., Sone M., Fukuta M., Kuroda  
S., Kaibuchi K., Nabeshima Y., Hama C.  
Identification of the *stef* gene that encodes a  
novel guanine nucleotide exchange factor specific  
for Rac I. *J. Biol. Chem.* 274, 17837-17844  
(1999)

5) Murata S., Kawahara H., Tohma S.,  
Yamamoto K., Kasahara M., Nabeshima Y.,  
Tanaka K., and Chiba T. Growth retardation in  
mice lacking the proteasome activator PA28 $\gamma$ .  
*J. Biol. Chem.* 274, 38211-38215 (1999)

6) Inobe M., Katsube K., Miyagoe Y.,  
Nabeshima Y., Takeda S. Identification of  
EPS8 as a Dvl1-associated molecule. *Biochem.*  
*Biophys. Res. Comm.* 266, 216-221 (1999)

7) Yamashita T., Yoshitake H., Tsuji K.,  
Kawaguchi N., Nabeshima Y., Noda M.  
Retardation in bone resorption after bone marrow  
ablation in *Klotho* mutant mice.  
*Endocrinology* 141, 438-445 (2000)

8) Kato Y., Arakawa E., Kinoshita S., Shirai  
A., Furuya A., Yamano K., Nakamura K., Iida  
A., Anazawa H., Koh N., Iwano A., Fujimori  
T., Kuro-o M., Hanai N., Takeshige K.,  
Nabeshima Y. Establishment of the anti-Klotho  
monoclonal antibodies and detection of Klotho  
protein in kidneys. *Biochem. Biophys. Res.*  
*Comm.* 267, 597-602 (2000)

9) Yamashita T., Nabeshima Y., Noda M.  
High-resolution  $\mu$ CT (micro-computed  
tomography) analyses of the abnormal trabecular  
structures in *Klotho* gene mutant mice.  
*J. Endocrinology* in press

10) Impairment of B lymphopoiesis in  
precocious aging (*klotho*) mice  
Seiji Okada, Toru Yoshida, Zhang Hong,  
Genichiro Ishii, Masahiko Hatano,  
Makoto Kuro-o, Yoko Nabeshima, Yo-ichi  
Nabeshima, and Takeshi Tokuhisa  
*Int. Immunol.* in press

G. 知的所有権の取得状況  
準備中

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、klotho遺伝子座にlacZをノックインしたマウス、精神障害をもたらすヒト疾患の原因遺伝子であるLimKinase 1、プレセニリン結合蛋白、STEF1、及び肝臓、膵臓などで発現するKlothoホモログのノックアウトマウスの作成を試みた。Limkinase1欠損マウスは、全く変異が同定できないことから、Limkinase2とのダブルノックアウトマウスの作成したが、現時点では全く変異を見出すことができない。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、相同組み換えES細胞を分離し、ノックアウトマウスの作成を進めているところである。特にプレセニリン結合蛋白の強制発現は神経細胞死を抑制し、アルツハイマー脳では発現が著しく減少していることが明かとなり、神経細胞死を抑えるために重要な機能を担っていると推定されている。klotho遺伝子座にlacZをノックインしたマウスの解析により詳細な発現細胞の同定、null変異の変異表現型を確認した。

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) klotho遺伝子座にlacZ遺伝子をノックインし、その発現をトレースするシステムを開発する。プレセニンと結合する蛋白、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Lim kinase1, Lim kinase2をダブル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) 新たに見つかったKlothoホモログの ( $\beta$ -klotho) ノックアウトマウスの作製。

B. 研究方法

klotho遺伝子のエクソン1のATGコドンの下流にlacZ, Neo遺伝子を挿入した組み換えベクターを作成し、相同組み換えES細胞を分離し、ノックインマウスを作成した。このマウスはklotho遺伝子の

null変異でもあるので、変異表現型の解析とlacZ遺伝子の発現の両方を解析した。

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が、変異が確認できなかったことから、構造の保存されたホモログ, LimKinase 2とのダブルノックアウトマウスを作成し、発生、脳の形態、機能にちて解析した。

プレセニリン結合蛋白、STEF1, Klothoホモログ ( $\beta$ -klotho) 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、相同組み換え細胞を分離し、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

klotho遺伝子座にlacZをノックインしたマウスのホモの変異表現型は基本的には最初に分離したTA 20 (severe hypomorph) と同様であったが、少数ではあるが精子が形成されている。しかし、この精子の運動能が低く、不妊であることは変わらない。

発生過程を含めて、ノックインマウス個体を $\beta$ ガラクトシダーゼ染色をし、発現細胞を詳細に解析したところ、これまでに確認されていた発現細胞に加えて、脳の神経細胞核、下垂体、膵臓、副甲状腺などで発現することが明かとなった。さらにこの発現を指標に発現細胞をソーティングすることが可能となり、新たな展開を迎えている。

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したマウスの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。しかし、このノックアウトマウスの行動からはコントロールとな差が見出せず、Limkinase 1、Limkinase 2遺伝子のダブルノックアウトマウスを作成し、解析を行ったが、現時点では組織学的にも行動解析でも異常が見出されていない。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ることから、当面、全構造を明らかにすることをやめ、相同組み換え用のベクターの作成に必要な遺伝子構造の解析を行い、Neo, GT-A遺伝子を用いて組み換えベクターを作成した。500個を超える細胞を解析したが、相同組み換えクローンが得られておらず、さらに500個の解析を続行中である。さらに昨年報告された新しい方法であるRNAiを用いた機能欠損マウス作成を試みている。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、組み換え細胞を用いてマウス個体を作成中である。

#### 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。プロジェクトの途中で研究室を移転したために改めて至適条件等の検討を行ったことから、進展が遅れたが、全ての体制が整い、研究が進みはじめている。昨年来、新しい個体レベルの遺伝子機能解析法が話題になっているが、我々も、新たな方法の確立に着手しており、新しい方法が確立されれば、遙かに詳細な解析を短時間で行うことができるようになることを期待している。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いるにもかかわらず、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、Klotho遺伝子座にlacZ遺伝子をノックインしたマウス、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、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。Klotho遺伝子座にlacZ遺伝子をノックインしたマウスの解析によりKlotho遺伝子の詳細な発現細胞が明らかになり、同時にnull変異の変異表現型を確認した。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を作成したが、脳の形態、機能の異常が観察されていない。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。新たな方法の開発を試みており、任意の時期より遺伝子機能を改変する方法が確立されつつある。

#### F. 研究発表

1) Kato Y., Arakawa E., Kinoshita S., Shirai A., Furuya A., Yamano K., Nakamura K., Iida A., Anazawa H., Koh N., Iwano A., Fujimori T., Kuro-o M., Hanai N., Takeshige K., Nabeshima Y. Establishment of the anti-Klotho monoclonal antibodies and detection of Klotho protein in kidneys. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 267, 597-602 (2000)

2) 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. submitted

#### G. 知的所有権の取得状況

作成中



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生活習慣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、生活習慣や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。血中、尿中にリンの濃度が顕著に高いことから、リンの摂取量を食餌により制御したところ、オスにおいて変異表現型の回復が観察された。また、メスにおいては、リンの摂取制限と亜鉛の添加によりklothoの発現なしに変異症状が回復することが明らかとなった。また、リンの摂取量がklothoの発現に影響することが明らかになった。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。掛け合わせにより、遺伝的背景の違いが多彩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道が開かれた。klotho遺伝子の多型が代謝性疾患とリンクすることが明らかとなった。

A. 研究目的

ヒトゲノム計画により遺伝子の解読が進み、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連する遺伝子の探索、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

初年度の解析によりカルシウム、リンの血中、尿中濃度が顕著に上昇していることがわかり、食餌制限によりこれらの濃度を制御することを試みた。また、Klotho変異マウスにおいてこれに関連する遺伝子の発現変化があるか否かを調べた。さらに関連する遺伝子を網羅的に解析するために、Klothoマウスおよび野生型マウスの腎臓よりmRNAを調製し、DNAアレイを利用して発現が

変化しているmRNAを解析した。

一方、発症の遺伝子素因を解析する目的で、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。

klotho遺伝子の遺伝子多型を調べ、リンクする疾患や症状を解析した。

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、アルド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た。そこで、食餌中のリンの濃度を制限したところ、オスにおいて、体重増加、寿命の延長、生殖能力の回復など、様々な症状が改善することが観察された。また、これらのマウスではklotho遺伝子の発現が野生型の3分の1程度まで回復していることが明らかになった。さらに野生型マウスにおいても、食餌中のリンの濃度を制限するとklotho遺伝子の発現が上昇し、過剰に摂取す

るとklothoの発現が低下することが明らかとなった。野性型マウスの場合にはリンの摂取量を変えても、血液中のリンの濃度の変化はわずかであり、正常値を示していることから、影響がないように見えるが、これは生体の恒常性維持機構の結果であって、そのために生体では多くの変化が起こっていることを示している。次にメスにおいてはリンの摂取制限の効果が現れないが、驚いたことにメスではリンの摂取量を制限してもklotho遺伝子の発現上昇がほとんどないことが明らかとなった。そこで、メスにおいても変異表現型が回復する条件を検討したところ、リンの摂取制限に加えてオロット酸亜鉛を食餌に添加すると良いことがわかった。しかも、この場合はklotho遺伝子の発現はほとんど回復していないことも明らかとなった。

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た。一方、msmとの掛け合わせによりklothoマウスでは観察されない症状が現われることが明らかとなった。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おり、また、B6バックグラウンドでmsmの特定のクロモソ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。

KlothoマウスとコントロールマウスよりmRNAを調製し、DNAアレイにより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。それらの中からklothoマウスの変異症状と関連する一連の遺伝子群を導き出すことを試みたところ、腎臓における再吸収に関連する遺伝子が浮かび上がってきている。

遺伝子多型を調べる目的で2000組の双生児の遺伝子配列を調べ、疾病との関連を解析したところ、klotho遺伝子には7箇所遺伝子多型があることが明らかになった。これらのうち、2箇所はアミノ酸の変異を伴っており、5箇所の多型は骨密度の低下などの代謝性疾患とリンクすることが明らかとなった。

#### D. 考察

リンの摂取量がklothoの発現に影響することが明らかになったこと、亜鉛の添加によりklothoの発現なしに変異症状が回復することが明らかとなったことは重要である。

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道が開かれた。疾患を構成する多因子素因を如何に解析するかについては試行錯誤の段階にあり、解析法の発展に寄与するものと期待している。

klotho遺伝子の多型が代謝性疾患とリンクすることが明らかとなったが、将来は遺伝子診断の問題が浮上するものと思われ、その取扱いは慎重を期さねばならない。

#### E. 結論

血中、尿中にリンの濃度が顕著に高いことから、リンの摂取量を食餌により制御したところ、オスにおいて変異表現型の回復が観察された。また、メスにおいては、リンの摂取制限と亜鉛の添加によりklothoの発現なしに変異症状が回復することが明らかとなった。また、リンの摂取量がklothoの発現に影響することが明らかになった。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。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道が開かれた。klotho遺伝子の多型が代謝性疾患とリンクすることが明らかとなった。

#### F. 研究発表

準備中

#### 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た。中枢神経系ネットワーク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、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* 遺伝子は特にpostmitoticになって移動しているintermediate zoneの神経細胞や、移動を終えて、神経突起伸長やシナプス形成の段階にあると考えられるcortical plateの神経細胞、および、成体の海馬のdentate gyrusやolfactory bulb、およびlateral migratory pathwayのなど、成体になっても発生途上の神経細胞が多く含まれている領域で発現している。STEFはRac1に対してはGEF活性を持つが、Cdc42やRhoAに対しては活性を持たない。また、ヒトKB細胞にSTEFを強制発現させるとアクチンフィラメントを細胞膜直下領域に集積させて、ラップリング膜を誘導することが観察された。このとき、STEF自身もラップリング膜を形成している領域に共局在する。この現象は、Rac1のドミナントネガティブ体を共発現させると抑制されたことから、STEFはRac1特異的な活性化因子として作用し、アクチン細胞骨格系を変化させることを示している。STEF蛋白質が細胞膜領域に局在するためにはN末端側の一部の領域(PHnTSSドメイン)が必要であり、またラップリング膜形成のためにはさらにDHドメインが必要である。一方、PHnTSSドメイン単独では、活性型STEFのドミナントネガティブ体として作用する。N1E115神経芽細胞腫細胞株にSTEFを強制発現させると、分岐の多い神経突起様構造が誘導され、また、内在性のSTEFの活性をドミナントネガティブ体(PHnTSS)の強制発現によって阻害すると、この細胞の血清非存在下における神経突起伸長が阻害された。以上から、STEFはRac1特異的な活性化因子として作用し、神経突起伸長に関与していることが明らかになった。

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。中枢神経系の回路網の形成・成熟には、神経細胞の移動、神経突起の伸長、シナプス形成などの段階が複雑に絡み合っているが、いずれにおいても細胞外の環境（細胞外シグナル）に適切に応答したアクチン細胞骨格系の変化が必要とされている。Rac, Rho, Cdc42などのRho類似G蛋白質はubiquitousな分子であるが、細胞外からのシグナルに応答して必要なときに必要なだけ細

胞内の局所で活性化され、様々なアクチン細胞骨格系の変化を引き起こすことが知られている。我々は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。この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、および培養細胞系を用いた実験などから、この分子がRac1の活性化を介したアクチン細胞骨格系の再構成を制御することによって、神経回路網の形成に関与していることが示唆されており、その分子機構の解明を目的として本研究を行った。

B. 研究方法

マウス脳よりRT-PCR法を用いて、*sif*遺伝子のマウスホモログ*stef*をクローニングした。in situ ハイブリダイゼーションにより、各発生段階の中枢神経系における発現様式を調べてみたところ、*stef* 遺伝子はマウス脳の一部の領域でのみ発現していた。STEFがどのG蛋白質のGEFとなっているのかをin vitroの生化学的アッセイで調べた。同時にラップリング膜形成の誘導を観察した。Rac1のドミナントネ

ガティブ体の共発現により上記現象の抑制を観察した。いろいろなドメインを欠失したSTEF蛋白質をKB細胞に強制発現させ、STEF蛋白質が細胞膜領域への局在、ラップリング膜形成を観察した。N1E115神経芽細胞腫細胞株にSTEF、あるいはドミナントネガティブ体 (PHnTSS) を強制発現し、神経突起伸長を観察した。

## C. 研究結果

### (1) *stef* 遺伝子のクローニング

ショウジョウバエの*still life (sif)*は行動異常を示す突然変異体から同定した遺伝子であり、そのコードするSIF蛋白質は神経系のシナプス末端内に局在し、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ている(Science, 1997)。次いで、マウス脳よりRT-PCR法を用いて、*si*遺伝子のマウスホモログ*stef*をクローニングした。STEF蛋白質はSIFと良く似たアミノ酸配列からなり、2つのPHドメインと1つのPDZドメインおよびグアニンヌクレオチド交換因子(DH)ドメインを含んだ細胞内蛋白質であることが予想された。

### (2) *stef* 遺伝子の発現

ノーザンハイブリダイゼーションにより*stef* 遺伝子は特に中枢神経系において強く発現していることが明らかになった。また、*in situ* ハイブリダイゼーションにより、各発生段階の中枢神経系における発現様式を調べてみたところ、*stef* 遺伝子はマウス脳の一部の領域でのみ発現していた。将来大脳皮質になる領域ではE12.5から発現が始まり、特にpostmitotickになって移動しているintermediate zoneの神経細胞や、移動を終えて、神経突起伸長やシナプス形成の段階にあると考えられるcortical plateの神経細胞で強い発現が認められた。これらの領域では、POくらいまでは発生と共に発現が強くなっていくが、その後発現が徐々に低下し、adultの大脳皮質では発現量はかなり低くなっていた。しかしながら、成体においても、海馬のdentate gyrusやolfactory bulb、およびlateral migratory pathwayの神経細胞ではSTEFの強い発現が認められたが、これらの領域はいずれも成体になっても発生途上の神経細胞が多く含まれていることが知られている領域である。この結果から、STEFは発生過程で神経細胞移動や、神経突起伸長、シナプス形成などの動的現象を盛んに行っている細胞で何らかの役割を果たしていることが示唆された。

### (3) STEF蛋白質はRac1特異的なグアニンヌクレオチド交換因子である

STEFはDHドメインを含んでいるため、Rac, Rho, Cdc42などのRho類似G蛋白質のグアニンヌクレオチド交換因子活性(つまりGEF活性)を持つことが期待される。そこで、STEFがどのG蛋白質のGEF

となっているのかをin vitroの生化学的アッセイで調べたところ、この分子はRac1に対してはGEF活性を持っているが、その他のCdc42やRhoAに対しては活性を持たないことが明らかとなった。また、ヒトKB細胞にSTEFを強制発現させるとアクチンフィラメントを細胞膜直下領域に集積させて、ラップリング膜を誘導することが観察された。このとき、STEF自身もラップリング膜を形成している領域に共局在する。この現象は、Rac1のドミナントネガティブ体を共発現させると抑制されたことから、STEFはRac1特異的な活性化因子として作用し、アクチン細胞骨格系を変化させるということが明らかになった。

### (4) STEF蛋白質のドメイン解析

いろいろなドメインを欠失したSTEF蛋白質をKB細胞に強制発現させたところ、STEF蛋白質が細胞膜領域に局在するためにはN末端側の一部の領域(PHnTSSドメイン)が必要であり、またラップリング膜形成のためにはさらにDHドメインが必要であることがわかった。おそらくこのPHnTSSが、STEFが神経細胞内の局所に局在するために必要な領域なのであろう。また、PHnTSSドメイン単独では、活性型STEFのドミナントネガティブ体として作用するということが明らかになった。

### (5) STEFは神経突起伸長に関与している

N1E115神経芽細胞腫細胞株は血清存在下では神経突起を伸ばさずに球状の形態をしているが、血清を除くと神経突起を伸長することが知られている。また、この細胞は内在性にSTEFを強く発現している。血清存在下でこの細胞にSTEFを強制発現させると、分岐の多い神経突起様構造が誘導されてきた。これらの構造はGAP43、チューブリンなどの神経突起のマーカーでも染色された。また、内在性のSTEFの活性をドミナントネガティブ体(PHnTSS)の強制発現によって阻害すると、この細胞の血清非存在下における神経突起伸長が阻害された。以上から、STEFはN1E115細胞の神経突起伸長に関与していることが明らかになった。

## 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が発生途上の神経系において、神経細胞移動や神経突起伸長、あるいはシナプス形成といった

動的な過程で何らかの役割を果たしているらしいことが予想されてきている。恐らく、細胞外からの様々なシグナルに応答し、神経細胞内の局所でRac1を活性化させることによって、アクチン細胞骨格系の適切な変化を引き起こしているのであろう。

機能ドメインが明らかになり、それを用いたtwo hybridシステムにより結合する分子の同定を進めており、それらを含めてさらにSTEFの機能について明らかにしていく。

#### 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* 209,1-9 (1999)

2) Hoshino M., Sone M., Fukuta M., Kuroda S., Kaibuchi K., Nabeshima Y., Hama C.

Identification of the stef gene that encodes a novel guanine nucleotide exchange factor specific for Rac I. *J. Biol. Chem.* 274, 17837-17844 (1999)

#### G. 知的所有権の取得状況

なし