

京都大学大学院医学研究科  
教授

鍋島陽一

「Klothoマウスをモデルとした  
ゲノム機能の体系的研究」

研究期間：平成12年11月～平成18年3月

## 1. 研究実施の概要

本計画は2000年に申請された。ゲノムの構造がまさに解き明かされつつあり、そのゲノム情報に基づいて新たな研究を立ち上げるべき時であった。「個々の素反応を分子レベルで解明すること」と「生命現象を統合的に解明すること」の2つの方向の重要性が想定された。本計画では後者の立場に立って膨大なゲノム情報を前にして、その統合的な解析から高次生命機能や疾病の成り立ちを演繹する方法論の構築とその生命科学研究への応用を目指す科学の発展にチャレンジすることを掲げた。

具体的には、*klotho* マウスをモデルシステムとしてゲノム科学の発展と個体の成り立ちとその機能低下が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。なお、遺伝子素因の解析やメガゲノムの網羅的解析を効率的に進めるためには、マウスの遺伝学的解析、並びにゲノムプロジェクトに関する専門的知識と実験的蓄積が必須であることから、かねてより協力者である城石（国立遺伝研）、（NIA/NIH）博士との共同研究により本プロジェクトを展開することとした。しかし、契約上の問題が生じて、この研究費での洪博士との共同研究は断念することとなり、（1）生命維持機構の統合的理解とその分子基盤、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）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を中心に進めることとなった。以下にその結果を簡単に記載する。

*Klotho* 変異マウスは多彩な老化関連疾患に類似の表現型を呈する。その原因遺伝子 *klotho* は I 型膜蛋白をコードしており、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、中でも鍵を握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り、ここにこのファミリーの特殊性がある。また、*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。

本研究により、*Klotho* が活性型ビタミン D 合成を負に制御すること、(Endocrinology 2002, Mol. Endocrinology, 2004)、*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 (Mol. Endocrinology, 2004)、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 (In preparation)、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示されたこと (J. Bone and Mineral Res. 2002)、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 (J. Biol. Chem. 2002) を明らかにした。

また、最近の研究により *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

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>ATPase の細胞表面へのリクルート、即ち、その機能を調節していること、カルシウム濃度の制御は Klotho・Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>ATPase による Quick-Local-Regulation と PTH、ビタミン D による Systemic-Hormonal-Regulation の 2 層からなっていること、Klotho・Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>ATPase システムはこの 2 つの制御系の鍵を握る分子として機能していることを明らかにした（投稿中）。

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>ATPase を細胞膜へリクルートするシグナルである細胞外カルシウム濃度の低下を認識し、そのシグナルを伝える機構に TRPV ファミリーが関わること、TRPV と Klotho の発現を誘導した HeLa 細胞では、細胞外カルシウムの低下に応答した Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>ATPase の細胞膜へリクルートを再現できること、Klotho は膜貫通ドメイン付近でプロセスされ、分泌されるが（FEBS Lett, 2004）、Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>ATPase の細胞膜へのリクルートには Klotho のプロセッシングが必須であることが明らかとなった。

Klotho KO アリルの遺伝的背景を標準的な実験用マウスである C57BL/6J(B6) と野生マウス由来系統である MSM/Ms に、ほぼ完全に置き換えた系統を作成し実験に使用した。これにより、より精度の高い遺伝学的解析が可能となった。今回の実験で、(MSM×B6)F<sub>2</sub>-k1<sup>K0</sup>/k1<sup>K0</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。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。

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 (Cyp 7 A1) の発現を負に制御すること (J. Clin. Invest. 2005) を明らかとした。Klotho と FGF23 ノックアウトの変異表現型が酷似していること、β-Klotho、FGFR4 (リガンドは FGF19) のノックアウト変異表現型が酷似していることを見だし、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 (J. Clin. Invest. 2005)。また、FGF シグナルの伝達にはヘパリンが必要であり、Klotho は弱い β-Glucuronidase 活性をもつこと (J. Biol. Chem, 2004) を併せ考えると極めて興味深い。

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た。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、その行動解析を行い、ヒトの精神行動を理解する上で極めて興味深い行動変異を確認した。

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 (EMBO 2003)。引き続き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した (Nature Cell Biol. In press)。

Klotho 変異マウスのレスキュー実験の過程で挿入突然変異により小脳皮質を欠失したマウス系統を樹立した。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 (Neuron, 2005)。

## 2. 研究構想及び実施体制

### (1) 研究構想

本計画はゲノムの構造がまさに解き明かされつつあり、そのゲノム情報に基づいて新たな研究を立ち上げるべき時代、2000年に申請された。このような時代背景のもと、本計画では膨大なゲノム情報を基盤として、その統合的な解析から高次生命機能や疾病の成り立ちを演繹する方法論の構築とその生命科学研究への応用を目指す科学の発展にチャレンジすることを掲げた。

具体的には、klotho マウスをモデルシステムとゲノム科学の発展と個体の成り立ちとその機能低下が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。なお、遺伝子素因の解析やメガゲノムの網羅的解析を効率的に進めるためには、マウスの遺伝学的解析、並びにゲノムプロジェクトに関する専門的知識と実験的蓄積が必須であることから、かねてより協力者である城石(国立遺伝研)、洪(NIA/NIH)博士との共同研究により本プロジェクトを展開することとした。しかし、契約上の問題が生じて、洪博士との共同研究は断念することとなり、(1) 生命維持機構の統合的理解とその分子基盤、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) 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を中心に進めることとなった。以下にその計画を簡単に記載する。

#### (1) 生命維持機構の統合的理解とその分子基盤、臨床応用に関する研究

klotho 変異マウスの多彩な老化症状の発症には生体の恒常性維持機構の破綻が大きく関わっており、特に電解質代謝、ビタミン及びホルモンによる生体機能の調節、血糖維持、水分量の調節(利尿)などの生命維持の根幹をなす調節機構の解析を中心に研究計画を立案した。更に生殖細胞の成熟など、次世代の誕生に関わる機構についても対象としたいと考えていた。

これらの機構は遺伝子にプログラムされた情報と外的要因の統合によって制御されているが、これまで、1 遺伝子の機能がこれほど多様な生命維持機構や生殖機構に関わっていることは全く知られておらず、新しい制御機構の存在を推定していた。

分子機構解明の中心課題は Klotho 蛋白と結合する分子の解明と Klotho 蛋白が  $\beta$ -glycosidase のホモログであることから、その酵素活性についての解析を中心に行うと考えていた。推定される活性中心の構造は特殊に変化しており、反応機構や基質に特性があるのではと推定していた。

肝臓、脾臓、脂肪組織などで発現する第2の klotho 遺伝子 ( $\beta$ -klotho) を同定していたことから、ノックアウトマウスの作成を含めてその機能解析を計画した。

ヒト疾患やヒトの老化における Klotho の意義を解析することを目的として抗 Klotho 抗体によるエライザーシステムの開発と診断法の確立を目標とした。

#### (2) 加齢疾患の成り立ちと発症に関与する遺伝子素因、遺伝子多型の研究

一般的に、マウス突然変異の表現型は、その変異がどのような系統の遺伝的背景にあるかによって大きく変化する。この現象は、変異表現型が修飾遺伝子と呼ばれる複数の遺伝子によって影響を受けること、また、それらの修飾遺伝子がマウス系

統間で多型的であることを示している。同様に、ヒト遺伝病においても主要な疾患遺伝子に加えて多数の修飾遺伝子が関与しており、病態のより深い理解に、主要疾患遺伝子や修飾遺伝子間の相互作用の解明が不可欠であることを示している。

よって、第1の課題として *Klotho* 変異表現型に影響を与える複数の修飾遺伝子の解析を目的とした。方法としては、1) MSM 系統への *Klotho* 変異遺伝子の戻し交配個体 (BCN2 世代ヘテロ) 間の交配から多数の progeny を作製し、*Klotho* 変異表現型の有無によってタイピングすると同時に全染色体についてゲノムスキャンを行って表現型と関連する親系統の特定染色体の組み合わせを検索し、ついで、2) 特定の MSM 系統由来の染色体が特定できたら C57BL/6J-MSM 系統間のコンソミック系統を用いた遺伝解析によって修飾遺伝子の高密度マッピングを行い、遺伝子の同定へと進めようと考えた。

第2の課題は老化関連遺伝子の多型とヒト疾患との連鎖についてであった。当時、ヒト *klotho* 遺伝子座の解析により9カ所の遺伝子多型 (SNP's) を見いだしており、少なくとも7カ所は老化関連疾患や代謝関連指標との連鎖が推定されており、広範な解析を継続する必要があると考えた。

### (3) 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

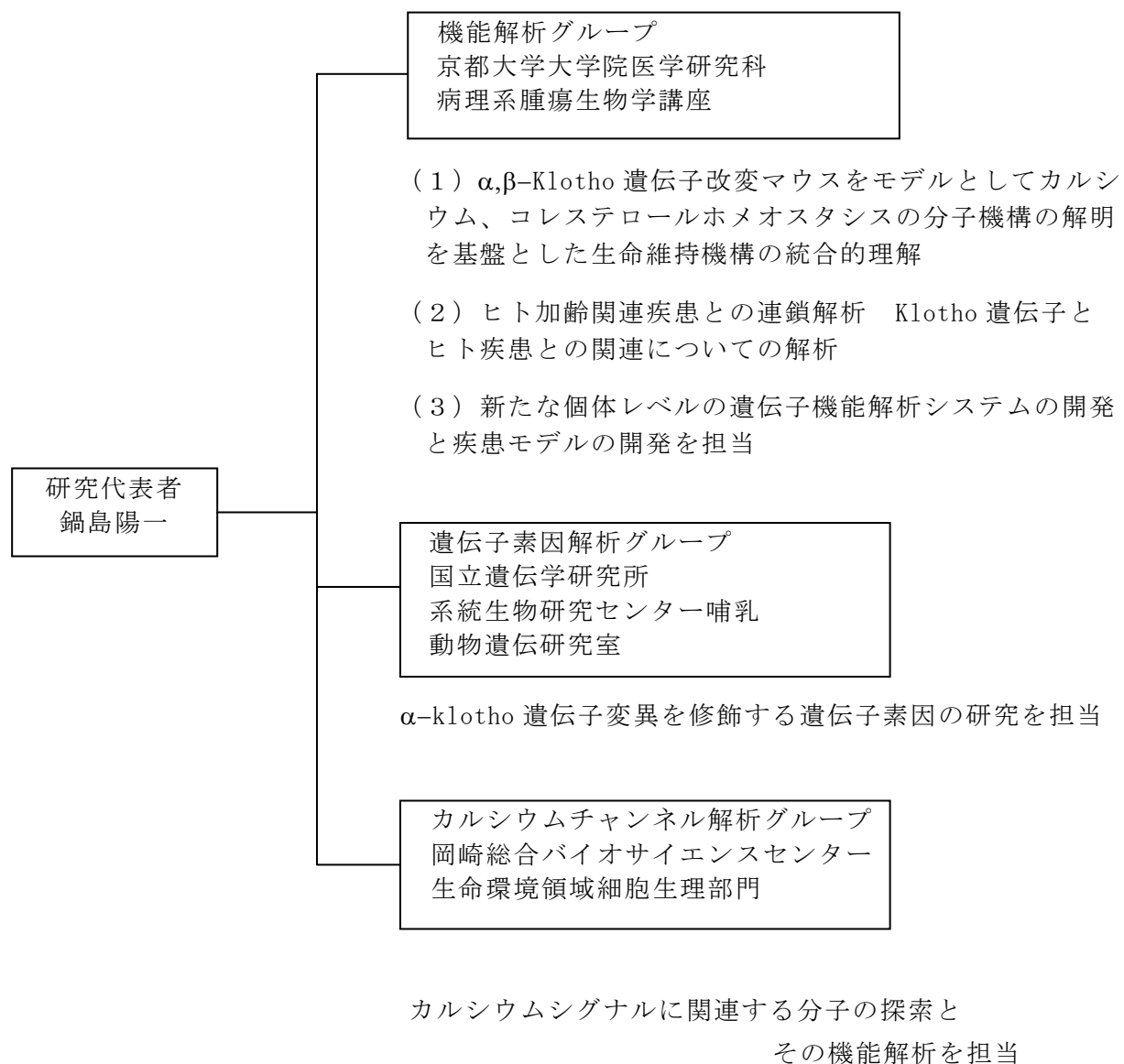
これまでの個体レベルの実験システムでは、ターゲット遺伝子の詳細な解析や多数の遺伝子を解析対象とするのは困難であることから、新たな方法の開発なしには、ポストシーケンス時代のゲノム研究に対応できない。そこで、個体レベルの遺伝子機能解析能力の飛躍的発展を図ることを目的として、「二本鎖 RNA の発現を利用した遺伝子機能欠損誘導系の開発 (マウスにおける RNAi の利用)」、「任意の組織や任意のタイミングで遺伝子変異を導入する方法の開発」を計画した。

### (4) 追加された課題、カルシウムチャンネルの解析

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>ATPase を細胞膜へリクルートするシグナルである細胞外カルシウム濃度の低下を認識し、そのシグナルを伝える機構に TRPV ファミリーが関わることが推定され、カルシウムチャンネルの電気生理学的解析を含めて共同研究が必要となり、TRPV チャンネルの専門家である富永チームを加えた。

本研究チームは2つのグループでスタートし、研究の進展により新たな領域が加わり、最終的には3チームにより研究を展開した。本研究は(1) *Klotho* をモデルとした生命維持機構の統合的理解、(2) *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おり、生命維持機構の統合的理解とヒト加齢関連疾患との連鎖解析を京大・機能解析グループが担当し、*klotho* 遺伝子変異を修飾する遺伝子素因の研究を遺伝研グループが担当した。また、生命維持機構の統合的理解の解析過程で TRP チャンネルの解析が必要になったことから生理研グループが加わった。新たな遺伝子機能解析システムの開発と疾患モデルの開発は京大グループを中心に進めることとした。

(2) 実施体制



### 3. 研究実施内容及び成果

#### 3. 1 機能解析グループ

京都大学大学院医学研究科病理系腫瘍生物学講座 (鍋島陽一)

##### (1) 研究実施内容及び成果

多彩な老化症状を呈する *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 *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。

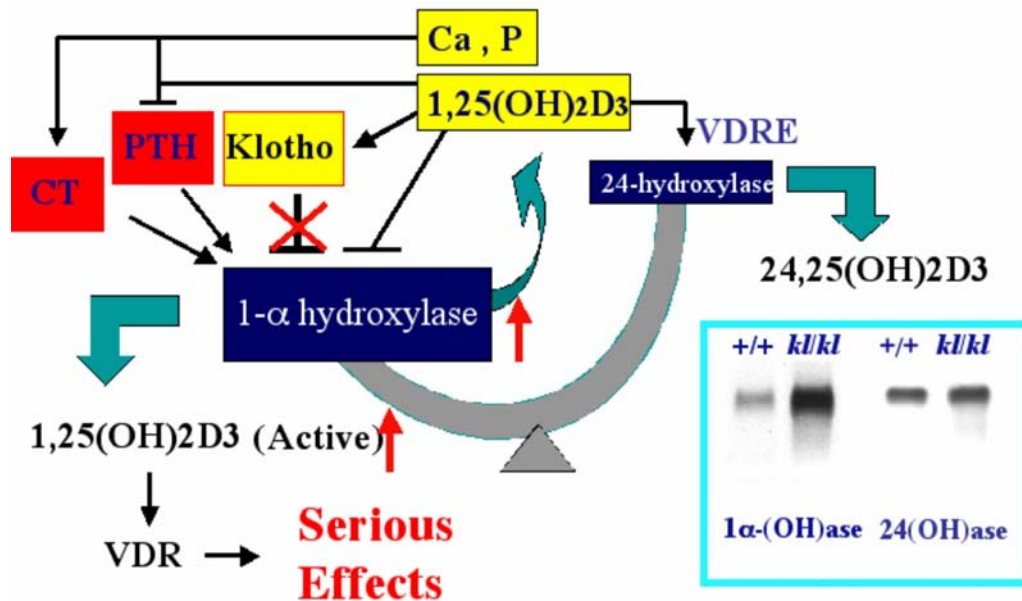
##### (1) *Klotho* 発現細胞の同定とその解析

*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、副甲状腺で強く発現している。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 (EcaC)、カルシウムの細胞内輸送を担うカルビンデイン D 28 K、カルシウム・ナトリウム交換因子、*Klotho* 蛋白が共発現しており、また、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase が強く発現していた。この結果から *Klotho* 発現細胞はカルシウム輸送において特殊な機能を担う細胞であることが強く示唆された。

##### (2) *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、*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。*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  $1\alpha$ -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 *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、*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  $1\alpha$ -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 D 28 K、*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し、ついで、発現上昇した *Klotho* 蛋白が  $1\alpha$ -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明らかとなった。また、血清ビタミン D、カルシウム濃度の亢進が  $\mu$  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。



### (3) ヒト疾患と *klotho* 遺伝子

遺伝子転座によって *klotho* 遺伝子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基づく症状が観察された。

ヒト *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得ていたが、詳細な解析により日本人閉経後女性においても、promoter 領域及び 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、*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 Klotho 蛋白質はビタミン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。

### (4) Klotho 蛋白質の酵素活性

Klotho 蛋白質は Type 1 glycosylase の一員であることから、Klotho・Fc キメラ蛋白質を培養細胞で高発現させ、酵素活性を解析したところ、 $\beta$ -Glucuronidase 活性を示した。基質特異性が極めて高く、 $\beta$ -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、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、 $\beta$ -Estradiol 3- $\beta$ -D-glucuronide, Estrone 3- $\beta$ -D-glucuronide, Estriol 3- $\beta$ -D-glucuronide などのステロイド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。Klotho 蛋白質はステロイド-グルクロナドからグルクロン酸を切り取る  $\beta$ -グルクロナダーゼ活性を有している。グルクロン酸の切断かグルクロン酸を認識することが Klotho の機能の本質である可能性を示唆している。

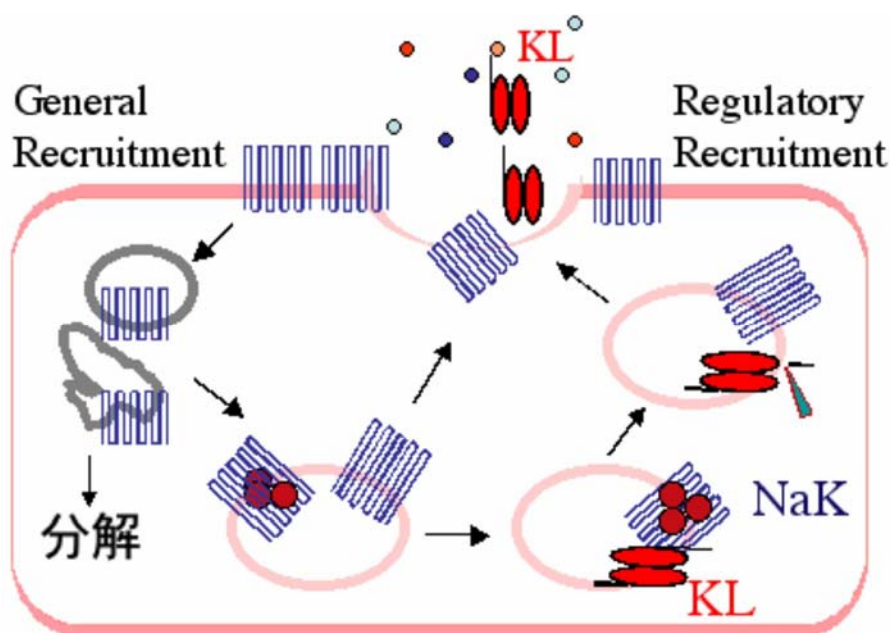


### (5) Klotho 蛋白のプロセッシングと分泌型 Klotho 蛋白

ヒト klotho 遺伝子の解析からN端側のドメインよりなる70 k dの分泌型 Klotho 蛋白の存在が推定された。そこで、70 k d 分泌型 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、マウス、ヒト血清中より分泌型 Klotho 蛋白の同定を試みたが、見いだせなかった。そこで、新たな抗体を作成し、検討したところ、130 k Dの分泌型蛋白を見いだした。この分泌型 Klotho は全長型より膜結合ドメインのN端側でプロセスされたものである。

### (6) Klotho・Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase によるカルシウムホメオスタシスの制御

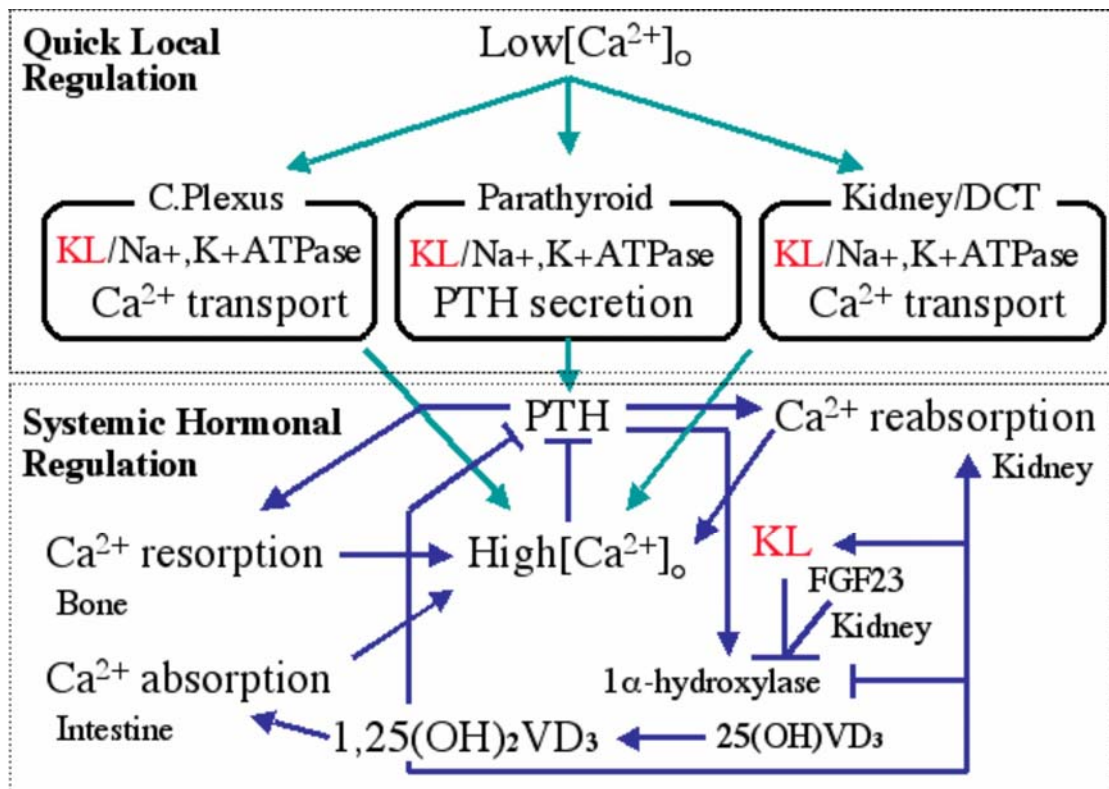
Klotho はI型膜蛋白であるが細胞内に多量に存在し、その一部はNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase と結合している。Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase にはリン酸化状態の異なる2つのフォームがあり、細胞膜上には低リン酸化フォームが存在し、Klotho は細胞内顆粒において高リン酸化フォームと特異的に結合しており、細胞外のカルシウム濃度の低下に素早く応答して Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase の細胞表面へのリクルート、即ち、その機能を調節している。Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase の細胞表面へのリクルートは細胞外カルシウム濃度の低下をシグナルとして制御されており、細胞膜上の Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase 量が瞬時に増大する。



Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase は細胞内外の Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>の濃度勾配を作り出す分子であり、作り出された Na<sup>+</sup>の濃度勾配の増大と Na/Ca Exchanger の機能が連動し細胞からのカルシウムの汲みだしが制御されており、脈絡膜における大循環から脳脊髄液へのカルシウムの移送、腎臓遠位尿細管におけるカルシウムの再吸収が亢進する。また、上皮小体では血清カルシウム濃度の低下に伴い細胞膜電位の変化、細胞内電解質濃度の変化がもたらされ、副甲状腺ホルモン(PTH)の分泌が誘導される。しかし、Klotho 変異マウスではこれらの反応が障害されており、脳脊髄液のカルシウム濃度が低下し、多量のカルシウムが尿中へ漏出し、PTHの分泌が低下する。

カルシウム濃度の制御にはビタミン D による腸管からのカルシウムの吸収も重要である。Klotho は活性型ビタミン D 合成の律速酵素 (Cyp27B1) の発現を負に制御する因子として機能しており、Klotho を欠失すると血清の活性型ビタミン D 濃度が亢進し、高カルシウム、高リンがもたらされる (Mol. Endocrinology 2004)。

これらの結果を総合するとカルシウム濃度の制御は PTH、ビタミン D を中心とした回路網、すなわち Systemic Hormonal Regulation と Klotho・Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase による Klotho 発現細胞におけるカルシウム輸送の制御、すなわち Quick Local Regulation の 2 層からなっており、Klotho はこの 2 つの制御系の鍵を握る分子として機能している。



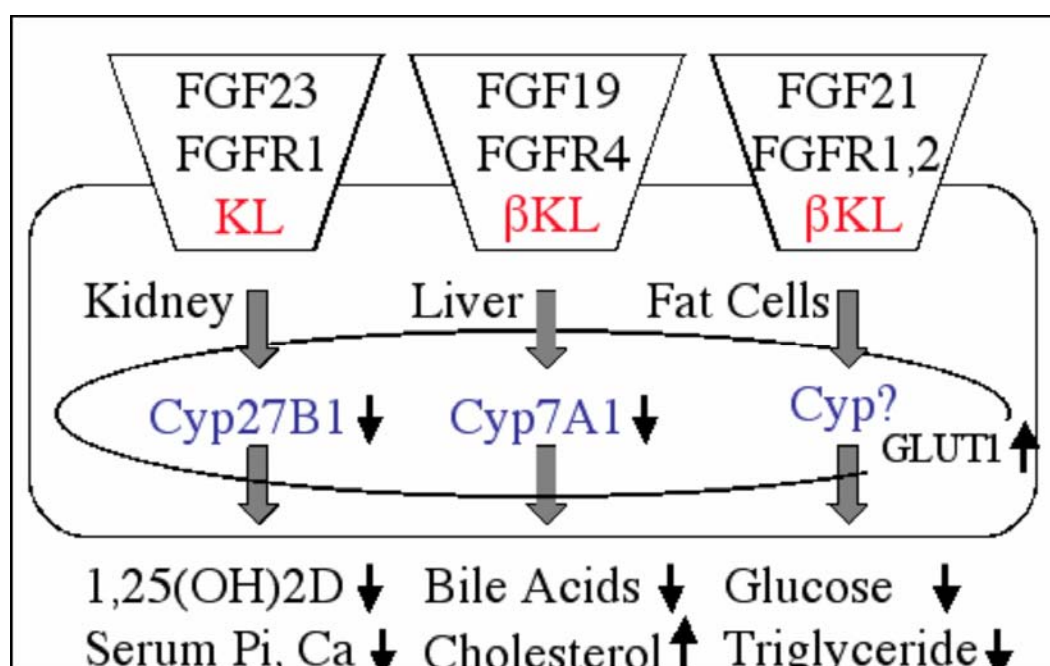
(7)  $\beta$ -klotho 遺伝子ノックアウトマウスの作成と解析

第 2 の分子である  $\beta$ -klotho 遺伝子を同定した。脂肪細胞、肝臓、小腸粘膜などで発現しており、ノックアウトマウスを作成した。 $\beta$ -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別の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、コール酸へと変換する酵素遺伝子 (Cyp7A1) の亢進、二次的な HMG-CoA Reductase の顕著な亢進が観察された。

(8) klotho ファミリーと循環する FGF による恒常性の制御

FGF23 ノックアウトマウスの変異表現型は血清ビタミンDの亢進、高リン、高カルシウムを示し、Klotho 変異マウスの表現型と極めて類似している。ホモログである  $\beta$ -Klotho は肝臓、膵臓、脂肪細胞で発現し、そのノックアウトではコレステロールから胆汁酸を合成する律速酵素 (Cyp7A1) の顕著な発現亢進、二次的な HMG CoA Reductase (コレステロール合成の律速酵素) の発現亢進、胆汁酸の糞便への排出が観察されるが (J. Clin. Invest. 2005)、この変異表現型は FGFR4 (FGF19 がリガンド) ノックアウトマウスのそれとそっくりである。これらの結果は FGF シグナルと Klotho あるいは  $\beta$ -Klotho が深く関わっていることを示唆している。FGF ファミリーの中で FGF23、FGF19 及び FGF21 は特殊な存在で血中を循環し、シグナル伝達因子として機能している。ちなみに FGF21 は脂肪細胞に作用し GLUT1 の発現を亢進させ、脂肪細胞へのグルコースの取り込みを増加させ血糖値を低下させると報告されている。

培養細胞系に Klotho を発現させると FGF23 のシグナルが入る。また、 $\beta$ -Klotho を発現させた際の FGF19、FGF21 のシグナル伝達について解析している。更に FGF シグナルの伝達にはヘパリンが関与することはよく知られた事実であり、興味深いことに Klotho には弱い  $\beta$ -Glucuronidase 活性があり (J. Biol. Chem. 2004)、FGF のシグナル伝達に関わる可能性が高い。



FGF の多様性に比して FGF 受容体は少なく、しかも共通の受容体が各種の細胞に発現している。とりわけ、循環している FGF 群がどのようにしてターゲット細胞の受容体の特異的に認識してシグナルを伝えるかは謎であり、Co-factor の存在を推定させる。我々はこの FGF のシグナル伝達システムに Klotho、 $\beta$ -Klotho が関与していると推定しており、「循環する FGF と Klotho ファミリーによる生体恒常性の制御」

という新たな概念へと発展させたいと考えている。また、カルシウム、コレステロール、グルコースの恒常性制御は生体恒常性維持の根幹を成すものであり、同時にその異常は生活習慣病など、各種の疾患の基盤を成すものであることから、その制御システムの解明により迫りくる高齢化社会の要請に応えたいと考えている。

#### (9) 新たな遺伝子機能解析法の開発

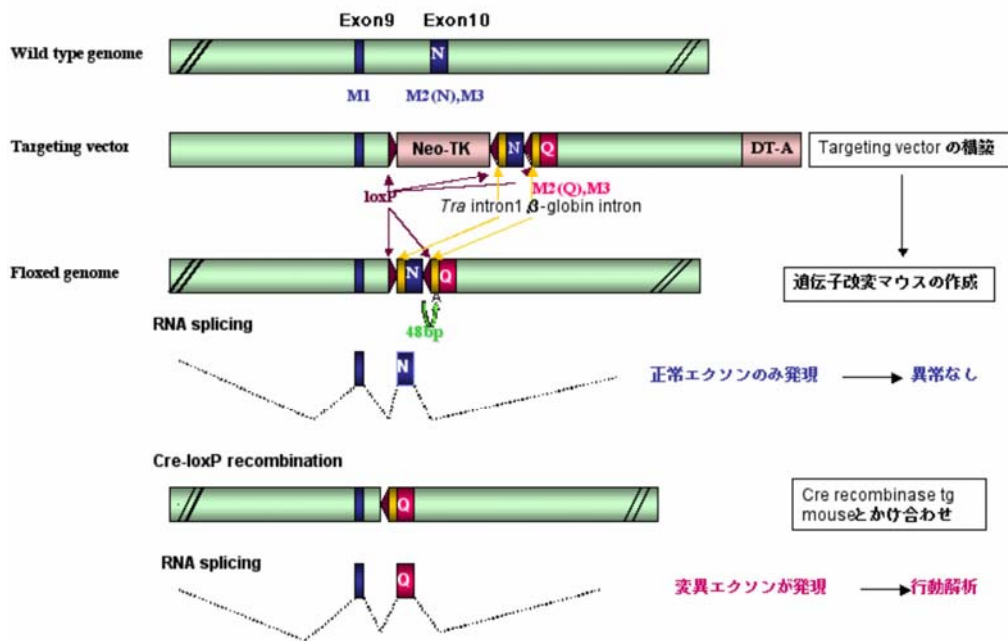
個体レベルで遺伝子機能を詳細に解析するにはこれまでのノックアウト、細胞・時期特異的ノックアウト、トランスジェニックマウス技術では不十分であり、更なる遺伝子機能解析技術の開発が必要である。その一貫として、“任意の組織や任意のタイミングでターゲット遺伝子にアミノ酸置換や遺伝子変異を導入する方法の開発”に取り組む、成功した。特に機能局在が重要な要素となっている脳において、この新しい遺伝子改変技術を導入して NMDA 受容体についてその機能の改変を試みたところ、統合失調症類似の表現型を示すマウスが得られた。

今回、この方法を応用してターゲット遺伝子として NMDA 受容体の NR2A 遺伝子を用いて、海馬歯状回のみで神経興奮（脱分極）に伴うカルシウム流入を制御している Mg<sup>2+</sup>ブロック機構に必要なアミノ酸であるアスパラギンをグルタミンに変換し、海馬歯状回のみで Mg<sup>2+</sup>ブロックが解除されるマウスを作成した。

NMDA 受容体のカルシウム透過性を司るとされている M2 部分のアミノ酸であるアスパラギン一個をグルタミンに置換する変異を導入した変異型エクソンを作成し、正常エクソンの下流に導入したターゲットベクターを構築した。この2つのエクソンの間には人工イントロンが挿入されている。人工イントロンのスプライシングドナーサイトとスプライシングのブランチポイントの A までの距離を 48 塩基とした。スプライシング反応では、この間の長さが 51 塩基以下だとスプライスされず、エクソンを読み飛ばすとされており、通常、変異エクソンは読まれない。ところが、Cre-リコンビネースを作用させて、lox-P（正常エクソンの上流と人工イントロン中に存在する）に挟まれた正常エクソンを切り取るとイントロンがスプライシングに必要な長さ以上となって変異型エクソンを発現することができる。

このベクターを ES 細胞に導入し、相同組み換えマウスを作成した。この段階のマウスでは変異型エクソン（Gln 型）は発現しておらず、NMDA 受容体は正常に機能している。事実、ホモでも異常が観察されず、野生型と区別がつかない。今回の実験では、この相同組み換えマウスと海馬歯状回で特異的に Cre リコンビネースを発現するトランスジェニックマウスとかけあわせた。できあがったマウスでは、海馬歯状回でアミノ酸置換をもたらす遺伝子変異が観察されたが、他の領域では観察されない。

## NMDA receptor NR2A



従来より海馬が記憶、学習に関与する重要な部位であると同時に、その傷害が統合失調症、鬱病などの精神疾患とも関連することが報告されていたが行動解析を行ったところ、活動量の亢進、プレパルスインヒビションの顕著な減弱、常同行動の増加等の表現型が認められた。これらの行動異常は、薬物投与で作成された精神疾患モデルマウスや統合失調症患者で観察される行動異常のパターンと類似しており、海馬歯状回が精神行動形成に重要な生理的役割を負っていることが示唆された。海馬 CA1, CA3 については学習、記憶、行動との関連が解析されているが、歯状回についての解析は、その神経回路網に於ける重要性にも関わらず遅れており、本実験により歯状回的基本的な機能が明らかになると同時に、その機能異常をもたらす精神行動形成異常の解明に貢献できると考える。また、その発展として、薬剤開発のアクセシシステムとしての活用、新たな関連分子のピックアップの可能性など多面的な貢献が期待される。

### (10) 副次的な成果、小脳発生メカニズムの解明

分泌型 Klotho の機能を検討するために T g マウスを作成したところ、挿入突然変異によって小脳皮質を完全に欠損しているマウス系統が樹立された。分子遺伝学的解析により原因遺伝子として Ptf1a (bHLH) を同定した。Ptf1a の欠失により小脳の全ての GABA ニューロンが失われ、小脳に投射する基底核が消失する。また、Ptf1a 遺伝子を大脳の NMDA ニューロンが発生する脳室帯で発現させると、本来、NMDA ニューロンになるべき細胞がその形態、細胞移動の様式を含めて GABA ニューロンに分化した。よって、Ptf1a 遺伝子は小脳の GABA ニューロンの運命決定を制御する遺伝子であると推定された。なお、小脳皮質を完全に失ってもマウスは生存可能で、既に 2 年間生存している (Neuron, 2005)。



## (2) 研究成果の今後期待される効果

動物個体は生体内外の変化に的確に応答し恒常性を維持することに依って健康を保持している。液性生体応答の中心的課題は「カルシウムホメオスタシス、コレステロールホメオスタシス、グルコースホメオスタシス」の制御であり、本研究はまさにこの制御システムに新たな概念を吹き込もうとするものである。また、高齢者社会を迎え、生活習慣病の克服が課題となっているが、その成否はカルシウム、コレステロール、グルコース代謝異常に基づく病態の解明とその克服にかかっている。一方、本研究は、循環する FGF がターゲット細胞の受容体の特異的に認識しシグナルを伝える機構や、TRP チャンネルの新しい機能の解析、Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase のリサイクリングの分子機構の研究など、基礎研究としても大変興味深いものであり、これらの課題が解明されることの学術上の意義は極めて大きく、領域全体に強いインパクトを与える研究として大きく発展すると考えている。

### 3. 2 遺伝子素因解析グループ

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)

#### (1) 研究実施内容及び成果

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。Klotho 変異 (以下、オリジナル Klotho 変異) と Klotho ノックアウト変異 (以下  $kl^{ko}$  アリル) 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/MS 系統に置き換えたマウス (以下、MSM.  $kl$  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に研究を行った。

#### (1) 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。従って、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  $kl^{ko}$  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。

#### 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 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  $kl^{ko}$  マウスの病態を改善する特徴と考えられる。

#### 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  $kl^{ko}$  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  $kl^{ko}$  マウスの病態よりも重篤であった。

以上の特徴から、MSM.  $kl^{ko}$  系統は、オリジナル  $kl^{ko}$  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 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  $kl^{ko}$  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。

## (2) 寿命に影響を与える遺伝的背景

オリジナルKlothoマウスで報告されている様々な病理学的表現型が、MSM. k1系統では異なっている事を見いだした。最も注目すべきは MSM. k1系統の寿命がオリジナルklothoマウスよりも延長していることである。この寿命を延長させる修飾遺伝子の遺伝学的手法による同定を試みたが、オリジナルKlothoマウスを遺伝学的解析に用いるには2つ問題点があった。一つはオリジナルKlothoマウスの遺伝的背景はC57BL/6J (以下B6) とC3H系統の雑種であり、遺伝学的な考察が複雑になる事、もう一つはオリジナルKlothoマウスは、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 変換輸送体遺伝子を含むトランスジェンが klotho遺伝子の上流の転写調節領域に偶然挿入された変異マウスであり、Klotho遺伝子の配列が残っている。従って、オリジナルKlothoマウスの表現型は、挿入されたNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 変換輸送体遺伝子の影響やKlotho遺伝子の発現量の変化といった不確定な要因の影響を否定できない事である。そこで、これらの問題を解決するために、我々は、新たに京都大学医学部腫瘍生物学講座で開発されたklotho遺伝子機能を完全に欠失したnull変異をもつKlothoノックアウト (KO) アリル (k1<sup>KO</sup>) をB6及びMSM/Msの両系統への戻し交配を繰り返して導入し、B6を遺伝的背景に持つB6. k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>とMSMを遺伝的背景に持つMSM. k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>を作成した。平成17年度は、昨年に引き続きMSMを遺伝的背景に持つオリジナルのKlotho変異マウス(以下MSM. k1/k1)とMSM. k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>及びB6. k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>の生存期間について検討した。また、B6. k1<sup>KO</sup>/+とMSM/Msを交配して(MSM×B6)F<sub>1</sub>-k1<sup>KO</sup>/+を得たのち、このF<sub>1</sub>同士を交配することにより、(MSM×B6)F<sub>2</sub>-k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>個体群を作成して生存期間および生存期間を修飾する遺伝子座について検討した。

遺伝的背景の異なるKlothoノックアウトマウスであるB6. k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>とMSM. k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>との生存期間を検討した。B6. k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>群の平均寿命は71.4±20.9日(n=30)、MSM. k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>群の平均寿命は78.9±13.9日(n=55)であった。ノンパラメトリック生存分析により両群の75%、50%、25%生存期間を比較した。その結果、75%生存期間においてB6. k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>群は51.0±6.1日、MSM. k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>群は68.0±3.2日と差が認められ、MSM. k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>はB6. k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>よりも死亡開始時期が遅くなる傾向が認められた。しかし、MSM. k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>群の方がやや寿命が長い傾向にあるものの、平均寿命には統計学的に有為な差は認められなかった。当初、我々はMSM. k1/k1の平均寿命がオリジナルklothoマウスよりも延長していることに着目したが、今回のKlotho KOアリルを用いた解析では顕著な系統差は認められなかった。

そこで、次に、遺伝学的な解析を目的として作成した197個体の(MSM×B6)F<sub>2</sub>-k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>群について、生存期間を検討した。このF<sub>2</sub>個体集団の平均寿命は74.3±28.9日であった。最も長く生存した個体の生存期間はB6. k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>群が122日、MSM. k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>群が110日であるのに対し、(MSM×B6)F<sub>2</sub>-k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>群は177日であった。また、B6. k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>の平均寿命+3標準偏差(134日)以上生存した個体が11個体(約5.6%)存在した。以上の結果から、(MSM×B6)F<sub>2</sub>-k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>群は生存日数の個体差が大きく、B6とMSMの遺伝的背景にKlotho KOアリルの寿命に差異を及ぼす遺伝子座が存在する可能性が示唆された。また、B6. k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>とMSM. k1<sup>KO</sup>/k1<sup>KO</sup>の両系統の寿命を大きく上回る個体が存在する事から、その遺伝子座間にエピスタシスが存在する可能



性も示唆された。次に、寿命延長に影響を及ぼす遺伝子座を探索するための1次スクリーニングとして、(MSM×B6)F<sub>2</sub>-k1<sup>K0</sup>/k1<sup>K0</sup>群の内、生存期間が長かった上位22個体について、染色体全域に82のマイクロサテライトマーカーを設定して各遺伝子座の遺伝子型を決定した。この遺伝子型と寿命との関連性をカイ二乗検定で検討した結果、3番染色体を含む複数の染色体上に危険率0.01%で有意な相関を示す遺伝子座の存在が認められた。

## (2)研究成果の今後期待される効果

今回、Klotho K0 アリルの遺伝的背景を、標準的な実験用マウスである C57BL/6J (B6) と野生マウス由来系統である MSM/Ms に、ほぼ完全に置き換えた系統を作成し実験に使用した。これにより、より精度の高い遺伝学的解析が可能となった。今回の実験で、(MSM×B6)F<sub>2</sub>-k1<sup>K0</sup>/k1<sup>K0</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。今後、解析対象を全ての (MSM×B6)F<sub>2</sub>-k1<sup>K0</sup>/k1<sup>K0</sup>群に広げた QTL 解析を実施し、寿命に関連する遺伝子座の同定及びそれらの遺伝子座間のエピスタシスについて検討する必要がある。我々のグループは、MSM/Ms 系統の全染色体を一つずつ標準的な実験系統である C57BL/6J 系統の遺伝的背景に導入したコンソミック系統を樹立している。通常の QTL 解析で可能性のある染色体領域を同定した段階で、速やかにコンソミック系統を利用することで、修飾遺伝子同定の効率を大幅に上げることが可能である。今後、QTL 解析により可能性のある染色体を同定する予定であり、現在このコンソミックによる解析系へ移行する準備を進めている。

### 3. 3 カルシウムチャンネル解析グループ

岡崎総合バイオサイエンスセンター生命環境領域細胞生理部門

#### (1) 研究実施内容及び成果

TRP チャンネルの中で、上皮細胞での強い発現が報告されている TRPV4 が腎上皮細胞の basolateral 膜や脈絡叢に TRPV4 が発現することを明らかにしたが、TRPV4 の機能制御機構を更に明らかにする目的で、Yeast two-hybrid 法を用いて脳 cDNA ライブラリーから TRPV4 カルボキシル末端と結合する蛋白質を探索し、GABA-A 受容体が結合することを見いだした。更に、脳内の GABA-A 受容体の  $\alpha$  サブユニットに強く結合することを発見した。 $\beta$  及び  $\gamma$  サブユニットへの結合も観察しており、全サブユニットのクローニングと発現コンストラクトの作成を進めている。また、上皮 cDNA ライブラリーからも同様にして細胞骨格関連蛋白質との結合を発見した。どちらの蛋白質とも、native な組織での免疫共沈を確認しており、ドメインの GST 融合蛋白質の pull down assay による結合ドメインの narrow down を進めている。

#### (2) 研究成果の今後期待される効果

TRP チャンネルは各種の細胞外環境の変化を認識し、細胞が応答するシグナル伝達に関わる重要な遺伝子群として注目を浴びている。しかし、その機能、シグナル伝達システムについては多くは未解明であり、大きな進歩が期待されている。今回、カルシウム濃度低下を伝える細胞膜上の装置として TRP チャンネルが示唆され、解明の糸口が得られた。更に、HeLa 細胞に Klotho、TRPV チャンネルを発現させ、細胞外カルシウム濃度の低下をシグナルとして  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ATPase の細胞表面へのリクルートと Klotho の分泌量を制御できる解析系を構築しており、詳細な解析が可能となっており、本領域の発展に重要な貢献ができると考えている。

#### 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

1997年暮れに Klotho 変異マウスの発見、変異表現型、原因遺伝子についての論文 (Nature, 1997) を発表し、大きな話題となった。以来、40カ所を超える研究室と共同で Klotho 変異マウスの多彩な変異表現型の解析を行いつつ、Klotho 蛋白の機能解析を進めてきた。国内では約40カ所の研究施設に *klotho* 変異マウスを提供し、主にその変異表現型の解析を共同で行ってきた。循環器、骨、脳、肺における Klotho の意義が解析された。

海外では7カ所との共同研究を展開している。Klotho の立体構造解析 (フランス)、ビタミンD代謝における Klotho の役割 (アメリカ)、Klotho 異常症の解析 (アメリカ)、老化モデルとしての *klotho* 変異マウス (韓国、シンガポール、イギリス) がテーマである。また、最近、ヒト Klotho の遺伝子多型と寿命、成人病疾患の発症率の相関を解析している米国の Arking らをはじめ、多くのグループが独自の研究を展開し始めている。このような中で、本研究課題では、Klotho の生物学的役割と作用機構の解明、遺伝子多型、遺伝子素因、ヒト患者の発掘等の困難ではあるが、より本質的な課題に絞って研究を進めてきた。予想外のことが次々と明らかになり、解析は困難を極めたが、ようやく、その方向性が定まってきたと考えている。また、これまで、解析されてき

た領域との接点が明瞭となり、今後は厳しい競争にさらされると考えている。

動物個体が生体内外の変化に应答し、その恒常性を保つシステムについては過去に膨大な研究が積み重ねられてきたが、最近、その見直し機運が盛り上がっている。我々は予想を超えた新しい事実を次々と見いだしているが、とりわけ、Klotho・Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase 複合体が同定され、また、Klotho, β-Klotho と循環する FGF 群による生体恒常性の制御機構の存在が浮かび上がったことにより、全く新しい視点にたった生体应答システム、恒常性維持システムの研究が発展すると期待している。なお、細胞内外の変化や個体の取り巻く環境の変化に应答して恒常性を維持する機構は動物個体が生命と健康を維持するための基本的なシステムであり、また、変化に対する应答能の減退は生活習慣病や老化に伴う疾患の重要な発症要因と考えられている。よって、この研究は生命現象の根幹に関わる研究であると同時に迫り来る高齢化社会の要請に応える学際的研究領域を切り開く研究として発展すると確信している。

Klotho 変異マウスの発見以来、Klotho と多彩な変異表現型がどのように結びつくのか大きな謎であったが、本研究課題を中心とする研究により Klotho が生体恒常性の制御に関わっており、klotho 変異マウスでは内外の変化に対する应答能が破綻していることが示されたことにより本質的な理解に到達した。

また、Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase は 50 年来研究されてきた分子であるが、多くはそのポンプ機能と構造に関するもので、本研究によりその多彩な生物学的機能にメスが入り、大きく発展すると考えている。更に、Klotho, β-Klotho と循環する FGF 群による生体恒常性の制御機構の研究はまさに始まったばかりであるが、研究代表者らはその中核に位置していることから、大きな貢献ができると判断している。

一方、血清 Klotho 量が増加する Tg マウスではインシュリンシグナルが抑制され、寿命が延長するとの論文 (Science 2005) が発表され話題となったが、Klotho ノックアウトの表現型と相関しないことや血清 Klotho 値が顕著に亢進している患者の症状がインシュリンシグナルの抑制ではなく血清の活性型ビタミン D、カルシウム、リンの低下であること (Carpenter 未発表データ) と全く反した結果であることから、現時点での評価は困難である。また、腎臓の遠位尿細管で発現する Klotho が lumen 側 (原尿が流れている側) で TRPV5 (カルシウムチャンネル) の糖鎖のグルクロン酸を切断して TRPV5 を活性化し、カルシウム再吸収を促進するとの論文 (Science, 2005) が発表されたが、原尿には多量の Glucuronidase が含まれており酵素活性の極めて低い Klotho の寄与はほとんど想定できないことや迅速に制御されるべきカルシウム再吸収の制御が極めてゆっくりとした反応であることなど、疑問点も多く現時点での評価は困難である。

Klotho の発見以来、その本質を見極めるべく研究を積み重ねてきたが、その研究方向が明瞭になったこと、また、急速に研究が展開し、大きな広がりを見せている。一方、Klotho の機能を巡って明らかに混乱があり、着実、かつ慎重な研究の展開が求められている。

#### 4. 研究参加者

##### ① 機能解析グループ (京都大学)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
鍋島陽一	京都大学大学院 医学研究科	教授	全体の統括	H12.11.~H18. 3.
藤森俊彦	京都大学大学院 医学研究科	助手	Klotho 蛋白の機能解析, 研究指導	H12.11.~H18. 3.
伊村明浩	京都大学大学院 医学研究科	助教授 特任	Klotho 蛋白と結合する分子の探索	H13. 1.~H18. 3.
伊藤慎二	京都大学大学院 医学研究科	助手 特任	$\beta$ -klotho ノックアウトの解析	H12.11.~H17. 3.
岩野亜希子	京都大学大学院 医学研究科	CREST 技術員	Klotho 蛋白の機能解析の補助	H12.11.~H16.10.
高倉あゆみ	京都大学大学院 医学研究科	CREST 技術員	実験の補助、マウスの飼育、掛け合わせ	H13. 1.~H15. 9.
鷺田美和	京都大学大学院 医学研究科	CREST 技術員	実験の補助、Klotho 異常症患者の解析	H13. 1.~H14. 2.
鍋島曜子	京都大学大学院 医学研究科	CREST 研究員	新しい発生工学技術の開発	H12.11.~H18. 3.
黒滝陽子	京都大学大学院 医学研究科	CREST 技術員	発生工学技術の補助	H13. 1.~H18. 3.
寺尾真美	京都大学大学院 医学研究科	CREST 技術員	実験の補助、アレイによる発現解析	H14. 4.~H18. 3.
助野真美子	京都大学大学院 医学研究科	CREST 技術補佐員	実験の補助、マウスの飼育、掛け合わせ	H16. 4.~H18. 3.
遠山 治	京都大学大学院 医学研究科	大学院生	Klotho 蛋白の機能ドメインの解析	H12.11.~H16. 3.
前田良太	京都大学大学院 医学研究科	教務職員	Klotho の結合分子の機能解析	H17. 4.~H18. 3.
辻川 洋	京都大学大学院 医学研究科	大学院生	カルシウム代謝異常の解析	H12.11.~H16. 3.
池田大介	京都大学大学院 医学研究科	大学院生	$\beta$ -klotho 結合分子の解析	H12.11.~H16. 3.
辻 芳仁	京都大学大学院 医学研究科	大学院生	PTH 分泌機構の解析	H13. 9.~H17. 3.
木下聡子	京都大学大学院 医学研究科	大学院生	Klotho 測定システムの構築	H12.11.~H13. 7.
田村真弓	京都大学大学院 医学研究科	CREST 事務員	事務全般	H14. 9.~H18. 3.

② 遺伝子素因解析グループ (遺伝学研究所)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
城石俊彦	遺伝学研究所	教授	遺伝子座の決定、 表現型の解析	H12.11.~H18. 3.
前野哲輝	遺伝学研究所	技官	実験補助、マウスの飼育	H12.11.~H14. 3.
田村 勝	遺伝学研究所	CREST 研究員	修飾遺伝子の解析	H14. 1.~H15. 3.
陣内寅佳	遺伝学研究所	技官	実験補助、マウスの飼育	H14. 1.~H15. 3.

③ カルシウムチャンネル解析グループ (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
富永真琴	岡崎統合バイオ サイエンスセンター	教授	チームの統括と電気生理学的 実験	H16. 6.~H18. 3.
富樫和也	岡崎統合バイオ サイエンスセンター	大学院生	TRP チャンネルと Klotho の機 能関連の検討	H16. 6.~H18. 3.
三村明史	岡崎統合バイオ サイエンスセンター	大学院生	パッチクランプ法による TRP チャンネルと Klotho の検討	H16. 6.~H18. 3.

機構が雇用し派遣した研究員等

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
伊村明浩	京都大学大学院 医学研究科	CREST 研究員	Klotho 蛋白と結合する分子 の探索	H13. 1.~H14.12.
岩野亜希子	京都大学大学院 医学研究科	CREST 技術員	Klotho 蛋白の機能解析の補 助	H12.11.~H16.10.
高倉あゆみ	京都大学大学院 医学研究科	CREST 技術員	実験の補助、マウスの飼育、 掛け合わせ	H13. 1.~H15. 9.
鷺田美和	京都大学大学院 医学研究科	CREST 技術員	実験の補助、Klotho 異常症 患者の解析	H13. 1.~H14. 2.
鍋島曜子	京都大学大学院 医学研究科	CREST 研究員	新しい発生工学技術の開発	H12.11.~H18. 3.
田村 勝	遺伝学研究所	CREST 研究員	修飾遺伝子の解析	H14. 1.~H15. 3.
黒滝陽子	京都大学大学院 医学研究科	CREST 技術員	発生工学技術の補助	H13. 1.~H18. 3.
寺尾真美	京都大学大学院 医学研究科	CREST 技術員	実験の補助、アレイによる発 現解析	H14. 4.~H18. 3.
助野真美子	京都大学大学院 医学研究科	CREST 技術 補佐員	実験の補助、マウスの飼育、 掛け合わせ	H16. 4.~H18. 3.
田村真弓	京都大学大学院 医学研究科	CREST 事務員	事務全般	H14. 9.~H18. 3.

## 5. 成果発表等

(1)論文発表 (国内 0 件、海外 65 件)

1. 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)
2. 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)
3. Suga T., Kurabayashi M., Sando Y., Ohyama Y., Maeno T., Maeno Y., Aizawa H., Matsumura Y., Kuwaki T., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nagai R. Disruption of the *klotho* gene causes pulmonary emphysema in mice defect in maintenance of pulmonary integrity during postnatal life. *Am. J. Respir., Cell Mol. Biol.* **22**, 26-33 (2000)
4. 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* **164(2)**: 239-245, (2000)
5. Okada S., Yoshida T., Hong Z., Ishii G., Hatano M., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nabeshima Y., Tokuhisa T. Impairment of B lymphopoiesis in precocious aging (*klotho*) mice. *Int. Immunol.* **12**, 861-971 (2000)
6. Shiraki-iida T., Iida A., Nabeshima Y., Anazawa H., Nishikawa S., Noda M., Kuro-o M., Nabeshima Y. Improvement of multiple pathophysiological phenotypes of *klotho* (*kl/kl*) mice by adenovirus-mediated expression of the *klotho* gene. *J. Gene Medicine* **2**, 233-242, 2000
7. Utsugi T., Ohno T., Ohyama Y., Uchiyama T., Saito Y., Matsumura Y., Aizawa H., Itoh H., Kurabayashi M., Kawazu S., Tomono S., Oka Y., Suga T., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nagai R: Decreased insulin production and increased insulin sensitivity in the *klotho* mutant mouse, a novel animal model for human ageing. *Metabolism* **49**, 1118-1123 (2000)
8. Yamashita T., Yoshitake H., Tsuji K., Kawaguchi N., Nabeshima Y., and Noda M. Retardation in bone resorption after bone marrow ablation in *klotho* mutant mice. *Endocrinology* **141**: 438-445, 2000.
9. Saito Y., Nakamura T., Ohyama Y., Suzuki T., Iida A., Shiraki-Iida T., Kuro-o M., Nabeshima Y., Kurabayashi M., Nagai R. In vivo *klotho* gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **276 (2)** 767-772 (2000)
10. Yahata K., Mori K., Arai H., Koide S., Ogawa Y., Mukoyama M., Sugawara A., Ozeki S., Takai I., Nabeshima Y., Nakao K. Molecular cloning and expression of a novel *klotho*-related protein. *J. Mol. Med.* **78(7)** 389-394 (2000)
11. Ito S., Kinoshita S., Shiraishi N., Nakagawa S., Sekine S., Fujimori T., Nabeshima Y. Molecular cloning and expression analysis of a novel gene  $\beta$  *klotho*, which encodes a novel Klotho family protein. *Mechan. Dev.* **98**, 115-119 (2000)
12. Wakimoto K., Kobayashi K., Kuro-o M., Yanaka N., Yao A., Kita S., Iwamoto T., Azuma S., Toyota H., Omori K., Shigekawa M., Imahie H., Imai Y., Nabeshima Y., Komuro I. Targeted disruption of the mouse  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger gene leads to the defects in the heart beats and blood circulation in embryo. *J. Biol. Chem.* **275**, 36991-36998 (2000)
13. Mori K., Yahata K., Mukoyama M., Suganami T., Makino H., Nagae T., Masuzaki H., Ogawa Y., Sugawara A., Nabeshima Y., Nakao K.  
Disruption of *Klotho* gene causes an abnormal energy homeostasis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **278 (3)** 665-670 (2000)
14. 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)
15. 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)
  16. 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)
  17. Manabe N., Kawaguchi H., Chikuda H., Miyaura C., Inada M., Nagai R, Nabeshima Y., Nakamura K., Sinclair AM., Scheuermann RH., and Kuro-o M. Connection between B-lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. *J. Immunol* **167**, 2625–2631 (2001)
  18. 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)
  19. Yamagishi T., Saito Y., Nakagawa T., Takeda S., Kanai H., Sumino H., Kuro-o M., Nabeshima Y., Kurabayashi M., Nagai R. Troglitazone improves endothelial function and augments renal klotho mRNA expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats with multiple atherogenic risk factors. *Hepertens. Res.* **24** (6) 705–709 (2001)
  20. 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)
  21. Ito S., Fujimori T., Hayashizaki Y., Nabeshima Y. Identification of a novel mouse membrane-bound family 1 glycosidase-like protein, which carries an atypical active site structure. *Biochem. Biophys. Acta* **1576**(3) 341–345, (2002)
  22. Kashimada K., Yamashita T., Tsuji K., Nifuji A., Mizutani S., Nabeshima Y., Noda M. Defects in growth and bone metabolism in klotho mutant mice are resistant to growth hormone treatment. *J. Endocrinology* **2002 Sep**;174(3):403–410.
  23. Many H., Fujimori T. Nabeshima Y., Endo T. Klotho protein deficiency leads to overactivation of (Mu)-calpain *J. Biol. Chem.* **277** (38) 35503–35508 (2002)
  24. Kawano K., Ogata N., Chiano M., Molloy H., Kleyn P., Spector T.D., Uchino M., Hosoi T., Suzuki T., Orimo H., Inoue S., Nabeshima Y., Nakamura K., Kuro-o M., Kawaguchi H. Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. *J. Bone and Mineral Res.* **17**(10) 1744–1751 (2002)
  25. Yamashita T, Okada S, Higashio K, Nabeshima Y, Noda M. Double mutations in klotho and osteoprotegerin gene loci rescued osteopetrotic phenotype. *Endocrinology.* **2002 Dec**;143(12):4711–7.
  26. Takeshita K., Yamamoto K., Ito M., Kondo T., Matsushita T., Hirai M., Kojima T., Nishimura M., Nabeshima Y., Loskutoff D.J., Saito H., Murohara T. Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 with fibrin deposition in a murine model of aging, *Klotho* mouse. *Semin Thromb Hemost.* **Dec**; **28**(6):545–553 (2002)
  27. 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)
  28. 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)
  29. Kawauchi T, Chihama K, Nabeshima YI, Hoshino M. The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration. *EMBO J.* **2003 Aug 15**;22(16):4190–4201.
  30. Yahata K, Mori K, Mukoyama M, Sugawara A, Suganami T, Makino H, Nagae T, Fujinaga Y, Nabeshima Y, Nakao K. Regulation of stanniocalcin 1 and 2 expression in the kidney by klotho gene. *Biochem Biophys Res Commun.* **2003 Oct 10**;310(1):128–34.

31. Tsujikawa 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)
32. Tohyama O., Imura A., Iwano A., Jean Noel Freund, Henrissat B. Fujimori T., Nabeshima Y. *Klotho* is a novel  $\beta$ -glucuronidase capable of hydrolyzing steroid  $\beta$ -glucuronides. *J. Biol Chem.* **279(11)** 9777–9784 (2004)
33. 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)
34. 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 Letter* **565(1-3)** 143–147 (2004)
35. Shimada T., Takeshita Y., Murohara T., Sasaki KI, Egami K., Shintani S., katsuda Y., Ikeda H., Nabeshima Y., Imaizumi T. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging *Klotho* mouse. *Circulation* **110**, 1148–1155 (2004)
36. Hoshino M., Nakamura S. Mori K., Kawauchi T., Terao M., Nishimura Y.V., Fukuda A., Matsuo N., Sone M., Terashima T., Wright C. V.E., Kawauchi Y., Nakao K., Nabeshima Y. *ptfla*, a bHLH transcription gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron* **47**, 201–213 (2005)
37. Ito S., Fujimori T., Furuya A., Satoh J., Nabeshima Y., Nabeshima Y. Impaired negative feedback suppression of bile acid synthesis in mice lacking  $\beta$  *Klotho*. *J. Clin. Invest.* **115**, 2202–2208 (2005)
38. Toyama R., Nabeshima Y., Tsuji Y., Fujimori T., Nabeshima Y. Impaired regulation of gonadotropin-releasing hormone leads to the atrophy of the female reproductive system in *klotho*-deficient mice. *Endocrinology in press*
39. Kawauchi T., Chhama K., Nabeshima Y., Hoshino M., Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1, contributing to cortical neuronal migration. *Nature Cell Biol. In press*
40. Nabeshima Y. *Klotho*: A fundamental regulator of aging. *Ageing Res. Rev.* **1(4)** 627–638 (2002)
41. Nabeshima Y. *Klotho* deficient mouse: an in vivo model for human aging. Drug Discovery Today: *Disease Models Vol.1(3)* 223–227 (2004)
42. Furuse, T., Blizard, D. A., Moriwaki, K., Miura, Y., Yagasaki, K., Shiroishi, R. and Koide T.: Genetic diversity underlying capsaicin intake in the Mishima battery of mouse strains. *Brain Res. Bull.* **57**, 49–55, 2002.
43. Chan, B. W. H., Chan, Kwok-S., Koide, T., Yeung, Sau-m., Leung, M. B. W., Copp, A. J., Loeken, M. R., Shiroishi, T. and Shum, A. S. W. Maternal Diabetes Increases the Risk if Caudal Regression Casused by Retinoic Acid. *Diabetes*, **51**, 2811–2816, 2002.
44. Isobe, T., Yoshino, M., Mizuno, K-I., Lindahl, K. F., Kiode, T., Gaudieri, S., Gojobori, T. and Shiroishi, T. Molecular characterization of the Pb recombination hotspot in the mouse major histocompatibility complex class II region. *Genomics*, **80**, 229–235, 2002.
45. Furuse, T., Takano-Shimizu, T., Moriwaki, K., Shiroshi, T. and Koide, T.: QTL analyses of spontaneous activity by using mouse strains from Mishima battery. *Mammal. Genet.* **13**, 411–415, 2002.
46. Yada, Y., Makino, S., Chigusa-Ishiwa, S. and Shiroishi, T.: The mouse polydactylous mutation, luxate (*lx*), causes anterior shift of the anteroposterior border in the developing hindlimb bud. *Int. J. Dev. Biol.* **46**, 975–982, 2002.
47. Hide, T., Hatakeyama, J., Kimura-Yoshida, C., Tian, R., Takeda, N., Ushiro, Y., Shiroishi, T., Aizawa, S. and Mtsuo, I.: Genetic modifiers of otocephalic phenotypes in *Otx2* heterozygous mutant mice. *Development* **129**, 4347–4357, 2002.



48. 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.
49. 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 in press*.
50. 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. in press*
51. Nemoto M, Morita Y, Mishima Y, Takahashi S, Nomura T, Ushiki T, Shiroishi T, Kikkawa Y, Yonekawa H, and Kominami R. Ahl3, a third locus on mouse chromosome 17 affecting age-related hearing loss. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 1283–1288, 2004.
52. Abe K, Noguchi H, Tagawa K, Yuzuriha M, Toyoda A, Kojima T, Ezawa K, Saitou N, Hattori M, Skaki Y, Moriwaki K, and Shiroishi T. Contribution of Asian mouse subspecies *Mus musculus molossinus* to genomic constitution of strain C57BL/6J, as defined by BAC-end sequence-SNP analysis. *Genome Res.* **14**, 2439–2447, 2004.
53. Sakai T., Kikkawa Y., Miura I., Inoue T., Moriwaki K., Shiroishi T., Satta Y., Takahata N. and Yonekawa H. Origins of mouse inbred strains deduced from whole-genome scanning by polymorphic microsatellite loci. *Mammal. Genome* **16**, 11–19, 2005.
54. Ogasawara M., Imanishi T., Moriwaki K., Gaudieri S., Tsuda H., Hashimoto H., Shiroishi T., Gojobori T., and Koide T. Length variation of CAG/CAA triplet repeats in 50 genes among 16 inbred mouse strains. *Gene* **349**, 107–119, 2005.
55. Taguchi Y., Koide T., Shiroishi T., and Yagi T. Molecular evolution of cadherin-related neuronal receptor/protocadherin a (CNR/Pcdha) gene cluster in *Mus musculus* subspecies. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 1433–1443, 2005.
56. Meng W, Numazaki M, Takeuchi K, Uchibori Y, Ando-Akatsuka Y, Tominaga M and Tominaga T. DIP (mDia interacting protein) is a key molecule regulating Rho and Rac in a Src-dependent manner. *EMBO J.* **23**: 761–771, 2004.
57. Mandadi S, Numazaki M, Tominaga M, Bhat MB, Armati PJ and Roufogalis BD. Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium dependent desensitization of TRPV1 ion channels. *Cell Calcium* **35**: 471–478, 2004.
58. Dai Y, Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Kobayashi K, Yamanaka H, Tominaga M, Noguchi K. PAR2-mediated potentiation of TRPV1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *J. Neurosci.* **24**: 4293–4299, 2004.
59. Tominaga M and Caterina MJ. Thermosensation and pain. *J. Neurobiol.* **61**: 3–12, 2004.
60. Numazaki M and Tominaga M. Nociception and TRP channels. *Current Drug Target CNS & Neurological Disorders Dec*; **3**: 479–485, 2004.
61. Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S and Tominaga M. Sensitization of TRPV1 by EP<sub>1</sub> and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Molecular Pain* **1**:3–12, 2005.
62. Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Tominaga M and Noguchi K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J. Clin. Invest.* **115**: 2393–2401, 2005.
63. Tominaga M. Molecular mechanisms of trigeminal nociception and sensation of pungency. *Chemical Senses* **30**: i191–i192, 2005.
64. Tominaga M and Tominaga T. Structure and function of TRPV1. *Pfluger Arch – Eur. J. Physiol.* **451**: 143–150, 2005.
65. Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y and Tominaga M. TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO*

*J. 2005 (in press).*

66. Mandadi S, Tominaga T, Numazaki M, Murayama N, Saito N, Armati1PJ, Roufogalis1 BD, Tominaga M. PMA-induced increased sensitivity of desensitized TRPV1 occurs through PKC  $\epsilon$  -mediated phosphorylation at Ser 800. *Pain 2005 (in press)*

(2) 口頭発表

① 招待、口頭講演

主な発表掲載

1. Nabeshima Y. "Challenge of overcoming aging related disorders" SHISEIDO Science Symposium 2000 April 15, 2000 Tokyo
2. Nabeshima Y. "Challenge of overcoming aging related disorders" SAB Hakone Workshop May 8, 2000 Hakone
3. Nabeshima Y. "Klotho mouse: A model for human aging related disorders" Japan-USA Workshop on Mouse and Monkey Models for Studying Aging, Cardiovascular Diseases and Other Age-Related Chronic Disorders. July 4, 2000 Kyoto
4. Nabeshima Y. "Biological Importance of the Discovery of klotho Gene." "14th International Mouse Genome Conference Nov. 10, 2000 Yokohama
5. Nabeshima Y. "Biological importance of klotho gene related aging associated disorders" International Congress of Developmental Biology Symposium July 10th, 2001 Kyoto
6. Nabeshima Y. "Our life; from beginning to close" Symposium on stem cell biology, Japan-England exchange program of science Cambridge Dec. 2nd 2001
7. Nabeshima Y. "Activation of calcium dependent proteolysis during aging" Development of New Therapy for Muscular Dystrophy --Progress in Brain Research--Tokyo Jan. 17, 2002
8. Nabeshima Y. "Moleclar function of the Klotho protein" Workshop on Genetics of aging, Human Genome Meeting Shanghai April 16th 2002
9. Nabeshima Y. "Klotho: A fundamental regulator of calcium homeostasis" The 15th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for interactable diseases (III) Kanagawa Oct. 4, 2002
10. Nabeshima Y. "Klotho: A fundamental regulator of calcium homeostasis." The second JSPS science forum in Stockholm Stockholm Oct. 28, 2002
11. Nabeshima Y. "Klotho: a fundamental regulator of aging." The 4th Ilsong Symposium on aging Seoul Dec. 12, 2002
12. H. Tsujikawa, T. Fujimori, T. Yoshida, Y. Tsuji and Y. Nabeshima "KLOTHO, A GENE RELATED TO A SYNDROME RESEMBLING HUMAN PREMATURE AGING, FUNCTIONS IN A NEGATIVE REGULATORY CIRCUIT OF VITAMIN D ENDOCRINE SYSTEM" 16th Vitamin D conference Maastricht, July 8, 2003
13. Nabeshima Y. "KLOTHO: A Fundamental Regulator of Calcium Homeostasis" UK-Japan Symposium on Horizon in Ageing. Newcastle, Sept. 15, 2003
14. Nabeshima Y. "Klotho and Na,K-ATPase regulate the trafficking process of PTH secretary granules" The Endocrine Society's 87th Annual Meeting. San Diego, June 6, 2005

(3)特許出願 国内出願 (2 件) 海外出願 (0 件)

発明の名称：βKlotho 遺伝子、Cyp7a1 遺伝子、及びそれらの利用

出願日：2004年12月9日

出願番号：特願2004-357395

発明者：鍋島陽一 他3名

発明の名称：クロソ蛋白質の酵素活性の測定法及びその利用

出願日：平成15年5月23日

出願番号：特願2003-146953

特記事項：特許法第30条第1項の適用

発明者：鍋島陽一 他1名

(4)受賞等

①受賞 上原賞

②新聞報道

③その他

(5)その他特記事項

## 6. 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等 なし

(2)招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
ジャンマーク・クネル	Klothoノ細胞内ドメインに結合する分子の解析	京都大学大学院 医学研究科	14年5月より 8月末まで

## 7. 結び

既知の研究からは想定できないような事態が次々と明らかになり、当初は大きな困難に突き当たったが、結合分子の解析を通して突破口が開かれ、全く新しい領域を開くことができた。今後の方向性も明瞭となり、また、TRPチャンネル、FGFシグナル伝達など、新しい研究領域へと進む手がかりも得られ、最終的には実りの多いプロジェクトであった。

新たな研究プロジェクトを立ち上げ、大きくまとめあげて行きたい。