

氏名	伊藤慎二
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2820号
学位授与の日付	平成17年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科病理系専攻
学位論文題目	Roles of β Klotho in the negative feedback regulation of bile acid synthesis に関する研究 (胆汁酸合成の負のフィードバック制御における β Klotho の役割に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 清水 章 教授 北 徹 教授 中尾 一和

論 文 内 容 の 要 旨

Klotho を欠損するマウスは、カルシウム代謝の異常をはじめとした多彩なヒト老化様症状を呈し、早期に死亡する。我々は Klotho と非常によく似た構造の分子 β Klotho をコードする新規遺伝子 β klotho をマウス cDNA ライブラリーより単離した。 β Klotho は Klotho と同様に N 末端にシグナル配列、C 末端に 1 カ所の膜貫通領域を持つ I 型膜蛋白質であり、ファミリー 1 グリコシダーゼに相同性の高い 2 つのドメインの繰り返し構造を持っていた。 β Klotho と Klotho の間で対応するグリコシダーゼ様ドメインのアミノ酸配列の相同性は 40% 程度であったが、両者にはファミリー 1 グリコシダーゼの酵素活性にとって必須のグルタミン酸残基が置換されているという共通の特徴があり、置換のパターンが完全に一致していた。 β klotho 遺伝子の転写産物の発現様式をノーザンブロットング解析によって調べたところ、マウス成体においては肝臓及び脾臓で強く発現していた。また、胎生期では、胎生 11 日目以降、次第に発現が強くなっていくことが分かった。*in situ* ハイブリダイゼーション解析によって胎生期の発現をさらに詳しく調べたところ、 β klotho は、褐色および白色脂肪組織、卵黄嚢、腸管上皮においても強く発現していることが分かった。また脾臓での発現は外分泌部において強かった。

我々は β Klotho の生体内での機能を直接検討するために、遺伝子ターゲティングを行い β klotho ノックアウトマウスを作製した。 β klotho ノックアウトマウスは一見したところ正常であったが、軽微な成長遅延や血清コレステロール値の低下が認められた。コレステロールを体外へ排出する殆ど唯一かつ最大の経路は、肝臓における胆汁酸への変換と糞への排出である。そこで、我々は β klotho ノックアウトマウスにおける胆汁酸代謝を調べたところ、 β klotho ノックアウトマウスでは糞への胆汁酸の排泄が劇的に増加しており、また、コレステロールを胆汁酸に変換する過程の律速酵素であるコレステロール 7 α 水酸化酵素 (*Cyp7a1*)、および最も多量に存在する胆汁酸であるコール酸を生成するのに必須であるステロール 12 α 水酸化酵素 (*Cyp8b1*) の発現が野生型に比べて 5 倍程度昂進していた。胆汁酸合成酵素の発現は胆汁酸によって強力な負のフィードバック制御を受けるため、我々は次に餌に胆汁酸を加えその効果を調べた。その結果、野生型マウスでは餌の胆汁酸によって胆汁酸合成酵素の発現はほぼ消失したが、 β klotho ノックアウトマウスでは、*Cyp8b1* の発現は消失し、*Cyp7a1* の発現は消失しなかった。*Cyp7a1* と *Cyp8b1* は転写因子 SHP を介して共通の機構により制御されるが、 β klotho ノックアウトマウスでは SHP は機能を失っていなかった。これらの結果から β Klotho は *Cyp7a1* 特異的であり、かつ SHP に依存しない負のフィードバック機構の一員として機能している可能性が示唆された。さらに、 β klotho ノックアウトマウスにコレステロール胆石形成を誘導する餌を投与したところ、同一条件で飼育した野生型マウスでは全ての個体で胆石が形成されたのに対して、 β klotho ノックアウトマウスでは全く形成されなかった。これは胆汁酸過生成によりコレステロールの結晶化が妨げられたためと考えられる。以上の結果から、 β Klotho が胆汁酸代謝に極めて重要な役割を果たすことが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

本論文における研究によって Klotho 類似分子 β Klotho をコードする新規遺伝子 β klotho が単離された。 β Klotho はファミリー 1 グリコシダーゼに相同性の高いドメインの繰り返し構造を持つ I 型膜蛋白質であり、酵素活性にとって必須のグルタミン酸残基が保存されていないという Klotho と共通の特徴をもっていた。 β klotho は肝臓、脾臓、褐色および白色脂肪組織、卵黄嚢、腸管上皮において発現していた。

また本論文における研究では β klotho ノックアウトマウスが作製された。 β klotho ノックアウトマウスでは軽微な体重減少が認められた。さらに、糞への胆汁酸の排泄が劇的に増加しており、胆汁酸合成酵素であるコレステロール 7 α 水酸化酵素 (Cyp7a1)、およびステロール 12 α 水酸化酵素 (Cyp8b1) の発現が昂進していた。また胆汁酸を負荷すると、Cyp7a1 と Cyp8b1 発現を抑制する転写因子である SHP の発現誘導の異常や、Cyp7a1 拮抗的な抑制制御の異常が認められた。この他、コレステロール胆石の形成に対する耐性があった。これらのことから β Klotho が胆汁酸合成の負のフィードバック制御において重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

以上の研究は胆汁酸合成系の制御機構の解明に貢献し、コレステロール代謝異常や生活習慣病などの治療法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成17年1月17日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。