

氏名	とお やま おさむ 遠 山 治
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	医博第 2738 号
学位授与の日付	平成 16 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	Klotho is a novel β -glucuronidase capable of hydrolyzing steroid β -glucuronides (Klotho は、ステロイド-グルクロニドを加水分解する新規 β -グルクロニダーゼである)
論文調査委員	(主査) 教授 清水 章 教授 月田承一郎 教授 鍋島陽一

論 文 内 容 の 要 旨

個体の老化機序の解明は医学・生物学に残された最大の未解決課題の一つである。しかし、あまりに広範囲な現象を含むためにアプローチが難しく、その分子的解明は進んでいない。その中であって、単一遺伝子の欠損によって寿命の短縮、動脈硬化、中膜や軟部組織の石灰化、肺気腫など多彩なヒト型老化様症状を呈する *klotho* マウスが、当研究室において確立された。原因遺伝子 *klotho* がコードする Klotho 蛋白質は主に発現しているが、老化様表現型は発現部位を越え全身に及んでいる。このことから、*klotho* マウスの表現型には、液性因子が関与していることが示唆されている。また、Klotho 蛋白質は、細胞外に β -グルコシダーゼに相同性のある 2 つの繰り返し領域を持つ膜蛋白質であるが、酵素の活性中心を担うために必要な 2 つのグルタミン酸残基のうち、それぞれ 1 残基が置換されている。以前から、Klotho 蛋白質が実際に酵素として機能するか、またその場合、どのような物質が基質であるのかが問題であった。

そこで、申請者は組換え型 Klotho 蛋白質を調製し、 β -グルコシダーゼ活性測定に用いられている人工基質と反応させることで、Klotho 蛋白質が酵素活性を持つ可能性について検証した。

マウス Klotho の細胞外領域とヒトイムノグロブリン Fc 領域を融合させた分泌型の組換え型 Klotho 蛋白質を CHO 細胞に発現させ、培養上清から組換え型蛋白質を回収・精製し、蛍光分子 4methylumbelliferone (4Mu) に種々の単糖が結合している人工基質と反応させることにより酵素活性の検討に用いた。その結果、Klotho 蛋白質は、予期せぬことにグルクロン酸が結合している 4Mu-グルクロニドのみと特異的に反応した。すなわち、Klotho 蛋白質は、少なくとも *in vitro* では β -グルクロニダーゼとして機能することがわかった。

更に、Klotho 蛋白質の生体内での基質を推定するために、既知のグルクロニドが基質となるか否かを調べた。生体内に存在するグルクロニドには、プロテオグリカンやステロイド、アルカロイド、フラボノイドなどのグルクロン酸抱合体が知られている。申請者は、これらの化合物のうち、哺乳類において主要なグルクロニドであるプロテオグリカン及びステロイド-グルクロニドについて検討した。まず、Klotho 蛋白質による 4Mu-グルクロニド加水分解に対する阻害活性を指標に候補分子を絞った。続いて、阻害活性が見られた候補分子を高速液体クロマトグラフィーによって定量的に解析した。その結果、Klotho 蛋白質はエストラン類に分類されるエストロングルクロニド、エストラジオールグルクロニド、及びエストリオールグルクロニドなどのステロイド-グルクロニドを加水分解することが判明した。組換え型 Klotho 蛋白質によって加水分解を受けた基質には、フェノール性の構造 (ベンゼン環) が共通に見出された。

本研究により、Klotho 蛋白質は少なくとも *in vitro* では β -グルクロニダーゼとして機能することが明らかになった。更にステロイド-グルクロニドが、Klotho 蛋白質の有力な基質候補であることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請論文は、ヒトの老化に見られる症状と類似する表現型を持つ *klotho* マウスの原因変異遺伝子産物 Klotho 蛋白質の機

能解析を行ったものである。Klotho蛋白質は、 β -グリコシダーゼに相同性のある領域を細胞外に持つ膜蛋白質である。しかし、活性中心のアミノ酸が完全に保存されていないため、Klotho蛋白質が酵素であるかは不明であった。申請者は、組換え型Klotho蛋白質を調製し、人工基質と反応させることで、Klotho蛋白質が酵素活性を持つ可能性について検証した。当初、一次構造からグリコシダーゼ活性を想定したが、意外にも β -グルクロニダーゼ活性を有することが示された。Klothoが属するファミリーでグルクロニダーゼ活性が検出されたのは、新しい発見である。更に、Klotho蛋白質の生体内での基質を推定するために、天然グルクロニドが基質となる可能性を調べた。その結果、Klotho蛋白質はステロイド-グルクロニドを加水分解することが示された。本研究から、ステロイド-グルクロニドが、Klotho蛋白質の有力な基質候補であることが示唆された。これまでのKlotho研究は、マウスの表現型を切り口にするものが多く、Klotho蛋白質からのアプローチはなく、Klotho蛋白質の作用機序は不明であった。本研究は、Klotho蛋白質の作用機序の解明に貢献し、個体老化メカニズムの解明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16年2月12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。