

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591142

研究課題名（和文） クロソ分子機構におけるミトコンドリアエネルギー代謝との関連

研究課題名（英文） Molecular mechanism of Klotho gene in the mitochondrial bioenergetics during aging system

研究代表者

古賀 靖敏 （KOGA YASUTOSHI）

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：00225400

研究成果の概要（和文）：Klotho 遺伝子のノックアウトマウス（Klotho KO マウス）では、ヒトの老化に類似した種々の症状を来すことから、老化現象に関わる重要な遺伝子として報告された。我々は、Klotho KO マウスにおける老化現象と正常加齢マウス（CD-1）を比較検討し、老化機構における Klotho 遺伝子とミトコンドリア機能障害のネットワークを解明するために腎および脳組織における病理学的、生化学的解析を行った。正常加齢マウスでは、腎腫大が診られ、糸球体の減少と総タンパクの低下、ミトコンドリアの酸素消費の低下と電子伝達系酵素活性の全般的な低下が観察された。一方、Klotho KO マウスでは、正常糸球体数の減少と総タンパクの増加を伴う電子伝達系酵素活性の比活性の低下を来した。また、電子伝達系の酵素活性の中で、複合体 II が選択的に早期に低下する事を見いだした。終脳では、正常加齢のマウスでは電顕的なミトコンドリア腫大がみられミトコンドリア電子伝達系低下を伴っていた。Klotho KO マウスでは、その加齢減少に伴い、正常加齢マウスでは診られない、腎と脳でミトコンドリア機能不全を来し、その原因は、異常たんぱくの蓄積によると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Premature aging model (*klotho*, *kl^{fl}*) and natural aged (CD-1) mice were used to compare the mitochondrial energy metabolism and morphometrical property in kidney and brain. Natural aged mice tended to renal hypertrophy with decreasing glomerulus and decreased the total protein content, oxygen consumption and respiratory chain enzyme activities, complex I, II, I-III, II-III, and IV, in renal mitochondria. *Klotho* mice had contracted kidney with decreasing normal glomerulus and decreased oxygen consumption with increasing the total protein content, however the most respiratory chain enzyme activities retained in renal mitochondria. *Klotho* mice reduced only complex II and I-III activities. In endbrain, Natural aged mice had hypertrophic mitochondria with numerical decreasing and tend to decrease oxygen consumptions and respiratory chain enzyme activities in synaptosome and synaptosomal mitochondria. *Klotho* mice had atrophy of the cerebrum with abnormal distribution of neuronal cells in cerebral cortex layers, mortar region, and with atrophic mitochondria. *Klotho* mice preserved the oxygen consumptions and the respiratory chain enzyme activities, only reducing complex II activity, with increasing

total protein contents in synaptosome and synaptosomal mitochondria. *Klotho* mouse defected *klotho* gene expression causes the mitochondrial dysfunction in kidney and brain to change some morphological properties with similarities to natural aging mouse. However, the dysfunction and the morphometrical properties make some differences with the natural aging mice. It is indicated that *klotho* mouse induce mitochondrial dysfunction by abnormal proteins accumulation affected to neuronal migration that cerebral growth retardation occur for premature aging model.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ミトコンドリア、電子伝達系酵素、老化、複合体Ⅱ、エネルギー産生系異常、*Klotho* 遺伝子、KOマウス、早老症

1. 研究開始当初の背景

Klotho 遺伝子のノックアウトマウス (*Klotho* KO マウス) では、ヒトの老化に類似した種々の症状を来すことから、老化現象に関わる重要な遺伝子として報告された。この遺伝子は、グリコシダーゼ遺伝子ファミリーに属し、膜型と分泌型タンパクとして存在することが示された。最近、膜型 *Klotho* タンパクは、膜レセプターとして FGF23 分子と結合する事で、細胞内シグナル伝達を司り、カルシウムとリンの生体内恒常性に重要な機能を担っていることが報告された。しかしながら、*Klotho* 遺伝子の構造から想定されるその他の機能として、グリコシダーゼ活性を介した種々の酵素反応の制御、分泌型タンパクとしての全身臓器を標的とした機能に関しては、未だ解明されていない。

2. 研究の目的

Klotho 遺伝子の構造から想定されるその他の機能として、グリコシダーゼ活性を介した種々の酵素反応の制御、分泌型タンパクとしての全身臓器を標的とした機能に関しては、未だ解明されていない。我々は、*Klotho* KO マウスで、正常加齢と異なる、電子伝達系複合体Ⅱ活性の酵素生化学的並びに組織化学的な選択的低下を見だし、*Klotho* KO マウスにおける老化現象を介したミトコンドリア機能障害のネットワークを解明することが目的である。

3. 研究の方法

Klotho KO マウスでは、電子伝達系の酵素活性の中で、複合体Ⅱが選択的に早期に低下する事を見いだした。*Klotho* 分子の機能と複合体Ⅱの分子集成熟過程で、どのような接

点があるのかを解明するために、まず、予備実験と同じ生命現象が起こるかどうかを *in vivo* で確認する。確認された場合は、さらに、Klotho K0 マウスでの (1) ミトコンドリア DNA の量的質的異常の検討、(2) 複合体 II の 4 つのサブユニットすべての遺伝子発現状態の解析、(3) Klotho K0 マウス培養細胞系での複合体 II 遺伝子発現に与える Klotho 分子の影響に関し検討し、Klotho 分子種の機能とミトコンドリア電子伝達系酵素の活性発現調節の接点を解明する。

(1) マウスの作成

Klotho マウスは、*kl⁻/kl⁻* (Homo)、*kl⁻/kl⁺* (Hetero)、*kl⁺/kl⁺* (Wild) の 3 群について、また、正常加齢のマウス対照として CD-1 系の正常老化マウスおよび同系列の正常幼若マウスを用意した。

(2) マウスの生育状況の観察

体重増加曲線、運動機能、認知機能、死亡状況などの確認。

(3) 各臓器のマクロ検索

体重あたりの脳、心、腎、肝の湿重量を各群別に検討。

(4) 各臓器のミクロ検索

筋肉を含むすべての臓器・組織に関し、光顕および電子顕微鏡での形態観察を各群別に行う。光顕は、電子伝達系酵素活性を含む複合体 II (succinate dehydrogenase stain:SDH)、複合体 IV (cytochrome c oxidase:COX) の活性染色を行う。各臓器におけるミトコンドリアの形態観察を各群別に詳細に行う。

(5) 分離ミトコンドリアにおける電子伝達系酵素活性の網羅的解析

筋肉を含むすべての臓器・組織のミトコンドリアをショ糖濃度勾配において、遠心分離し、複合体 I、II、III、IV の酵素活性を各群別に測定する。

(6) 分離ミトコンドリアにおける酸素消費能の解析

筋肉を含むすべての臓器・組織のミトコンドリアをショ糖濃度勾配において、遠心分離し、オキシグラフによる酸素消費を各群別に測定する。

(7) ミトコンドリア DNA の質的量的異常の検討

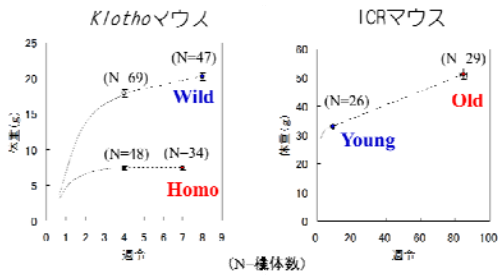
ミトコンドリア DNA の点変異もしくは大欠失の蓄積が Homo マウスに集積しているのかどうかをミトコンドリア DNA の全周にわたり塩基配列を確認する。また、マウスの 16SrRNA と α -アクチンをプローブとして、サザンブロット解析を行い、ミトコンドリア DNA の減少もしくは大欠失の有無に関し検討する。

(8) ミトコンドリアに発現する複合体 II サブユニットの発現解析

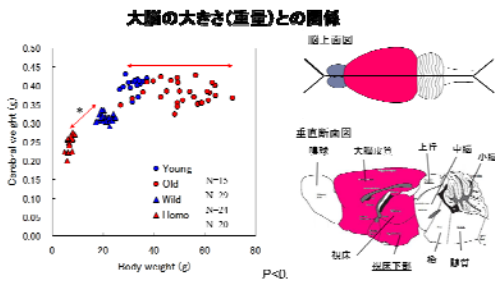
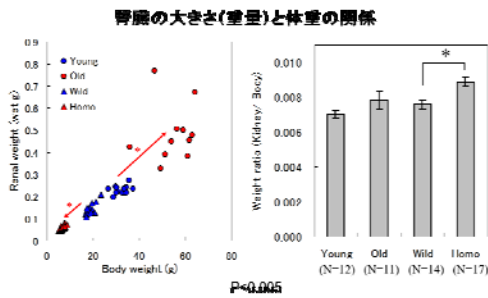
複合体 II またはコハク酸脱水素酵素は、4 つのサブユニットから成り、catalytic core である Flavoprotein (Fp: SDHA)、iron-sulfur protein subunit (IP: SDHB) とそれらをミトコンドリア内膜につなぎ止める役割を果たす 2 つの integral membrane protein subunits (SDHC、SDHD) で構成される。複合体 II の遺伝子発現に関し、臓器由来の分離 RNA におけるノザンブロットを行い、核遺伝子により発現している mRNA 量を各群で解析する。また、同じ検体で、RT-PCR を用いて、Homo マウスとその他のマウスで発現量が異なるのかを確認する。

4. 研究成果

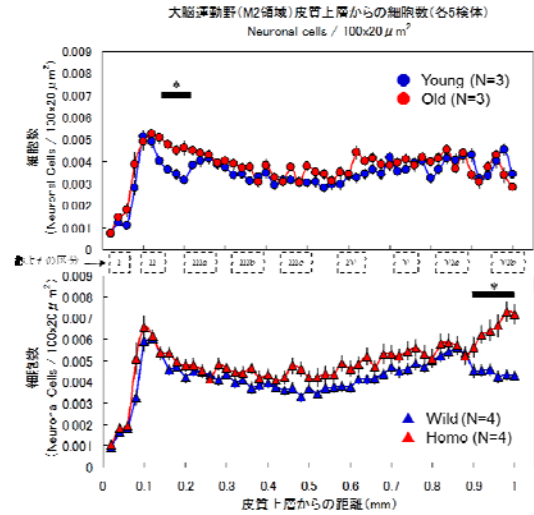
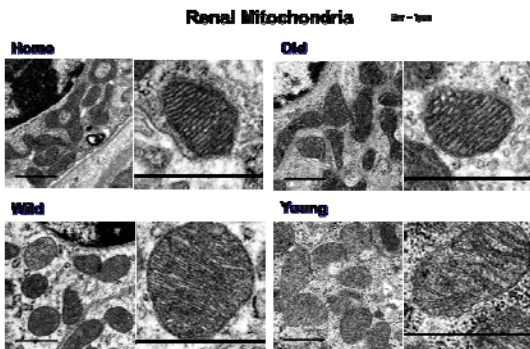
Klotho マウスは、*kl⁻/kl⁻* (Homo) は、成長障害、寿命の短縮、皮膚の萎縮、骨粗鬆症、活動性低下、大動脈動脈硬化、肺気腫、下垂体機能低下などの多彩な症状を呈した (図 1)。



この機能障害は、腎と脳組織で顕著に観察された。特に腎尿細管の石灰化、腎硬化症、プルキンエ細胞の脱落などが著明であった。

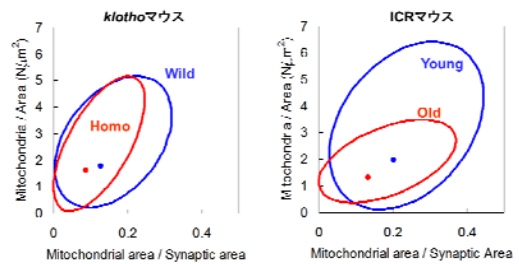


Klotho 遺伝子の発現消失により、全身臓器の石灰化がみられたが、その病態生理は未だ不明である。Klotho マウスでは、の老化機構にエネルギー産生系の関与があるかを検証する目的で、継時的にミトコンドリアの電子伝達系酵素活性を測定した。



脳神経細胞では、大脳皮質の運動野領域における神経前終末とそのミトコンドリアの形態解析を行ったところ、自然加齢と klotho モデルではその機能低下の特徴は若干異なり、また形態の変化にも自然加齢の変化とは異なることが明らかとなった。Homo マウスが持つ表現型としての器官・組織等の萎縮は、細胞および細胞小器官レベルから生じていることが考えられ、これは自然加齢の現象とは全く異なるものであった。

電子顕微鏡を使用した、高次微細構造では、正常加齢マウスが、単位面積当たりのミトコンドリア容積が減少するのに対して、Klotho マウスでは、単位面積当たりのミトコンドリア容積が増大していた。このことから、Klotho マウスでは、原因は不明であるが、ミトコンドリアの分裂状態が障害されており、これが電子伝達系酵素障害に関与している可能性が示唆された。



一方、電子伝達系酵素活性は、複合体 II での

意に低下していた。複合体Ⅱの抗体を用いた Blue-native gel では、複合体Ⅱの酵素タンパク全体が低下していた。

| Complex | ICR | | klotho | |
|---------|-------------|------------------|------------|------------------|
| | Young (N=6) | Old (N=6) | Wild (N=6) | Homo (N=6) |
| I | 989±158 | 859±152 | 416±52 | 442±59 |
| II | 535±93 | 186±20 (72%↓) | 586±30 | 376±54 (36%↓) |
| I+III | 309±32 | 254±18 (34%↓) | 362±59 | 307±51 |
| II+III | 254±21 | 196±22 (38%↓) | 310±47 | 313±28 |
| IV | 7295±1260 | 6671±832 | 5620±602 | 6432±1004 |
| CS | 1386±407 | 1719±403 | 754±114 | 737±144 |

しかしながら、これまでの研究では、この原因は明らかに出来なかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件) 全て査読あり

- (1) Shuichi Yatsuga, Yuji Hiromatsu, Shigekazu Sasaki, Hirotohi Nakamura, Koju Katayama, Junko Nishioka and Yasutoshi Koga. A two-day-old hyperthyroid neonate with thyroid hormone resistance born to a mother with well-controlled Graves' disease: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 2012;6:246 (DOI:10.1186/1752-1947-6-246)
- (2) Yasutoshi Koga, Nataliya Povalko, Junko Nishioka, Koujyu Katayama, Noriko Kakimoto, and Toyojiro Matsuishi. Molecular Pathology of MELAS and L-Arginine Effects. *Biochem Biophys Acta General* 2012; 1820:608-614
- (3) Shuichi Yatsuga, Nataliya Povalko, Koujyu Katayama, Junko Nishioka, Noriko Kakimoto, Toyojiro Matsuishi, Yasutoshi Koga. MELAS: A nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan. *Biochem Biophys*

Acta General 2012;1820:619-624

- (4) Yasutoshi Koga. *Biochemistry of Mitochondria, Life and Intervention* 2010. *Biochem Biophys Acta General* 2012;1820:551-552
- (5) Masamichi Ikawa, Kenichiro Arakawa, Tadanori Hamano, Miwako Nagata, Yasunari Nakamoto, Masaru Kuriyama, Yasutoshi Koga, Makoto Yoneda. Evaluation of systemic redox states in patients carrying MELAS A3243G mutation in mitochondrial DNA. *European Neurology* 2012;67(4):232-7 (DOI:10.1159/000336568)
- (6) Yasutoshi Koga, Nataliya Povalko, Koujyu Katayama, Noriko Kakimoto, Toyojiro Matsuishi, Etsuo Naito, Masashi Tanaka. Beneficial effect of pyruvate therapy on Leigh syndrome due to a novel mutation in PDH E1 α gene. *Brain & Dev.* 2012;34:87-91
- (7) Hirofumi Komaki, Yutaka Nishigaki, Noriyuki Fuku, Kei Murayama, Akira Ohtake, Yu-ichi Goto, Hiroyuki Wakamoto, Yasutoshi Koga, Masashi Tanaka. Pyruvate therapy for Leigh syndrome due to cytochrome c oxidase deficiency. *Biochem Biophys Acta general.* 2010;1800(3):313-315
- (8) Nishigaki Y, Ueno H, Coku J, Koga Y, Fujii T, Sahashi K, Nakano K, Yoneda M, Nonaka M, Tang L, Liou C, Paquis-Flucklinger V, Harigaya Y, Ibi T, Goto Y, Hosoya H, Dimauro S, Hirano M, Tanaka M. Extensive screening system using suspension array technology to detect mitochondrial DNA point mutations.

Mitochondrion. 2010;10(3): 300-308

- (9) Yasutoshi Koga, Nataliya Povalko, Junko Nishioka, Koujyu Katayama, Noriko Kakimoto, and Toyojiro Matsuishi. MELAS and L-arginine therapy-pathophysiology of stroke-like episodes. The New York Academy of Sciences. 2010; 1201:104-10
- (10) 古賀 靖敏: ミトコンドリア異常症. 小児科臨床 2010;63:881-886
- (11) 古賀 靖敏: ミトコンドリア病治療薬の現状と医師主導治験による新規治療法の開発. 医学のあゆみ 2010;232:759-764

[学会発表] (計 9 件)

- (1) 古賀 靖敏: ミトコンドリア病治療の最前線. PDHE1 α 欠損による Leigh 脳症に対するピルビン酸ナトリウムの臨床評価. 第 53 回日本先天代謝異常学会総会・第 10 回アジア先天代謝異常症シンポジウム. 2011. 11. 24-26. 千葉
- (2) Yasutoshi Koga: Satellite Meeting. Treatment of Mitochondrial Disease - now and in the future Conference 2011. 2011. 10. 24. New York (USA)
- (3) 古賀 靖敏: MELAS コホート研究に診られる成長障害の実態と GH に対する反応性. 第 45 回日本小児内分泌学会学術集会. 2011. 10. 6-8. 埼玉
- (4) Yasutoshi Koga: Mitochondrial Morphology, Cardiolipin. 5th SFPR-Asia 8th ASMRM 11th J-mit. 2011. 8. 31-9. 4. Kagoshima
- (5) Yasutoshi Koga: Beneficial effects of Pyruvate Therapy on Mitochondrial Myopathy. Mitochondrial Medicine 2011: Chicago. 2011. 6. 14-18. Chicago (USA)

- (6) Yasutoshi Koga: Mitochondrial Encephalomyopathies. XII International Congress on Neuromuscular Disease. 2010. 7. 17-22. Naples (Italy)
- (7) 古賀 靖敏: ミトコンドリア病研究の進歩と治療法開発の最前線. 第 52 回日本小児神経学会総会. 2010. 5. 20-22. 福岡
- (8) 古賀 靖敏: ミトコンドリア病の治療: 最新知見. 第 113 回日本小児科学会学術集会. 2010. 4. 23-25. 岩手
- (9) Yasutoshi Koga: Mitochondrial Myopathy, a Rare or a Common Human Disease? Based on Nation-Wide MELAS Cohort Study. 62nd AAN Annual Meeting. 2010. 4. 10-17. Toronto (Canada)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古賀 靖敏 (KOGA YASUTOSHI)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号: 00225400

(2) 研究分担者

ポバルコ ナターリア (Povalko Nataliya)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号: 10399181

(3) 研究分担者

西岡 淳子 (Nishioka Junko)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号: 00449919