

# 論文内容要旨

Klotho protects chromosomal DNA  
from radiation-induced damage

(Klotho は放射線障害から  
染色体 DNA を保護する)

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, in press.

主指導教員：正木 崇生教授

(広島大学病院 腎臓内科学)

副指導教員：田代 聡教授

(原爆放射線医科学研究所 細胞修復制御)

副指導教員：服部 登教授

(医系科学研究科 分子内科学)

中山 慎也

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

背景：

*klotho* 遺伝子は、老化様症状を呈するマウスの原因遺伝子として発見された。*klotho* 遺伝子から発現するタンパク質を *Klotho* と呼び、主に腎臓、脈絡膜、副甲状腺で発現している。*Klotho* には抗老化作用があり、*Klotho* の発現を抑制したマウスでは、生後 3~4 週といった早期から動脈硬化、骨粗鬆症、異所性石灰化、肺気腫、皮膚萎縮、筋萎縮などの早老症状が出現し、短命であることが報告されている。反対に、*Klotho* を過剰発現させたマウスは長寿である。*Klotho* は一回膜貫通型タンパク (~130kDa)として知られており、短縮可溶性型 (65kDa)、分泌型 (65kDa)といった 3つのアイソフォームが存在することが知られている。これらは細胞膜と血中、尿中で存在が確認されている。これまでの研究で *Klotho* はリン代謝に関わる線維芽細胞増殖因子 23 受容体 (FGFR)との相互作用が明らかにされている。FGFR と *Klotho* は共結合し、リン排泄を促進する。このため、*Klotho* 発現抑制マウスや *Klotho* 発現低下を認める慢性腎臓病患者や高齢者では、高リン血症が確認されており、その結果として血管石灰化などが生じ、老化が促進される可能性が示唆されている。しかしながら、*Klotho* の抗老化作用については未だ不明な点が多い。

一方で、老化は DNA 損傷と密接に関わっていることが知られている。DNA は常に化学物質や電離放射線などから損傷を受けている。電離放射線は、様々な種類の DNA 損傷の中でも最も重篤な損傷である DNA 二本鎖切断 (DSB)を誘導し、老化を促進することも知られている。DNA 損傷から細胞を保護するには、多くの DNA 損傷修復関連タンパクが関わっている。例えばヒストン H2AX は DNA 損傷の発生直後にリン酸化され  $\gamma$ -H2AX となり、DNA 損傷部位に集積する。 $\gamma$ -H2AX は DSB に対する細胞応答の初期段階のマーカーとして知られており、DNA 修復を促進する作用がある。さらに、DNA と直接結合することで DNA を保護する Dsup などのタンパク質の存在もクマムシでは知られている。しかし、*Klotho* の抗老化作用と DNA 損傷およびその修復との関連は未解明である。

そこで本研究で、ヒトの腎臓由来細胞とマウスの腎臓組織を用いて、電離放射線に特徴的な DNA 二本鎖切断 (DSB)を中心に *Klotho* と DNA 損傷およびその修復との関連を検討した。

方法：

- 1) ヒト近位尿細管上皮細胞 (HK-2 細胞) で *Klotho* 発現を抑制させるために、siKL-#1 と siKL-#2 の siRNA 2 種類を導入した。またヒト胎児由来腎臓上皮細胞 (293 細胞)に *Klotho* を過剰発現させるために、*Klotho*-GFP を導入した。両者に対して 3Gy、5Gy の電離放射線を照射し、生存率を評価した。
- 2) *Klotho* 発現を抑制した HK-2 細胞に 2Gy の電離放射線照射を行い、 $\gamma$ -H2AX の核内フォーカス形成を蛍光免疫染色用いて解析し、DNA 損傷誘導および修復カイネティックスを検討した。同様の実験を、*Klotho*-GFP を発現させた 293 細胞に対しても行った。さらに、FGF23 とそのレセプターである FGFR をノックダウンしたモデルでも同様の

実験を行った。

- 3) Klotho 発現抑制 HK-2 細胞に 15Gy の電離放射線照射を行い、中性 Comet Assay を用いて DSB を直接定量化した。
- 4) HK-2 細胞を分画し、ウエスタンブロットを用いて Klotho の分布を解析した。
- 5) Klotho 遺伝子破壊マウス (ノックアウトマウス) に対して電離放射線を照射し、Klotho と $\gamma$ -H2AX の免疫組織染色解析を行った。Klotho 過剰発現マウス (トランスジェニックマウス) についても同様の実験を行った。

結果：

- 1) HK-2 細胞に siKL-#1 を導入したところ Klotho の発現をほぼ完全に抑制したが、siKL-#2 では 50%未満の抑制であった。コントロール群、siKL-#1 群、siKL-#2 群に対して、電離放射線 (3Gy, 5Gy) を照射し、4 日後に細胞数を評価した。3 群の中で siKL-#1 群の生存率が有意に低下した。Klotho を過剰発現させた 293 細胞に関して同様の実験を行ったところ、コントロール群と比較し Klotho 過剰発現群で有意に生存率の上昇を認めた。
- 2) HK-細胞に siKL-#1、siKL-#2 を導入し、2Gy の電離放射線照射後に $\gamma$ -H2AX 核内フォーカスを解析した。0.5 時間、2 時間の段階で siKL-#1 群において、有意にフォーカス数の上昇を認めた。しかしながら 8 時間と 24 時間時点では差は認められなかった。FGF23、FGFR 両者の発現を低下させた群では、0.5 時間時点での $\gamma$ -H2AX の核内フォーカスに差は認めなかった。
- 3) 中性 Comet Assay を行い、DSB を反映する Tail Moment の解析を行った。HK-2 細胞 siKL-#1 群で放射線照射直後に有意に Tail Moment の上昇を認めた。
- 4) HK-2 細胞を核分画と細胞質分画に分離したところ、両分画で Klotho のシグナルが検出された。さらに細かく分離を行い、細胞質、細胞膜、核、クロマチン結合、細胞骨格に分画したところ、全分画で Klotho のシグナルが検出された。
- 5) Klotho ホモノックアウトマウスはヘテロノックアウトマウス、野生型マウスと比較し、電離放射線照射後 0.5 時間で $\gamma$ -H2AX のシグナルが有意に上昇していた。一方、トランスジェニックマウスでは $\gamma$ -H2AX のシグナルは有意に低下していた。

討論：

本研究では、抗老化作用をもつ Klotho タンパクと DNA 損傷との関連について検討した。ヒト腎臓由来細胞株を用いた実験では、Klotho の発現低下群で放射線照射後の生存率が低下し、照射直後の DSB が増加していることから、Klotho は放射線被ばくに対して DNA 保護作用がある可能性が示された。このことは、放射線照射後 8、24 時間の時点で $\gamma$ -H2AX フォーカス数がコントロールと有意差がないこと、さらに中性 Comet Assay を用いた DSB 定量化でもコントロール群と比較し Klotho 発現低下群では照射直後の DSB 量が有意に高

いこと、これまで **Klotho** 一回膜貫通型タンパクとして知られていた **Klotho** が核内のクロマチン結合分画でも検出されたことから支持された。またマウスモデルでも、**Klotho** の放射線被ばくに対する DNA 保護作用を有する可能性が支持された。

細胞膜で **Klotho** と共受容体を形成しリンの排泄を促進する **FGFR** や **FGF23** を発現低下させても、電離放射線照射後の **DSB** 量に変化は認めなかった。このため、電離放射線照射後の DNA 保護作用には、これまで報告されてきた **Klotho-FGFR** 共受容体を介したリン排泄促進とは異なる機序が働いていると考えられた。このことは、**Klotho** が核内のクロマチン分画にも存在することから、支持されている。

DNA 修復には様々なタンパクが関与しており、その多くは DNA 損傷の修復を促進することで細胞保護作用を示す。一方、**Klotho** 発現抑制細胞では放射線照射直後の **DSB** 量は多いが、修復スピードは遅くなかった。このため、**Klotho** は、ヒトで同定されている多くの DNA 損傷修復タンパク質とは異なり、染色体 DNA に直接結合し保護している可能性が示されている。このようなタンパク質は、クマムシ **Dsup** が知られているが、ヒトでは未だ報告されていない。今後、**Klotho** の抗老化作用を明らかにするためには、DNA 保護作用のメカニズムに関して、**Klotho** 核内移行メカニズムなどを含めた詳細な検討が必要と考える。