

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」

平成 18 年度採択研究代表者

鍋島 陽一

(京都大学医学研究科 教授)

「代謝応答を統御する新たな分子機構の研究」

1. 研究実施の概要

本年度は (1) Klotho ファミリーと循環する FGF 群によってコレステロール/胆汁酸、グルコース、カルシウム代謝が制御される機構と (2) α -Klotho/Na⁺, K⁺ATPase システムの詳細な機能解析を中心に研究を進め、以下の結果を得た。

(1) α -Klotho を発現させると FGF23 のシグナルが入り、 β -Klotho を発現させると FGF19, FGF21 のシグナルが伝わる解析システムを確立した。ついで、 α -Klotho が FGFR1 と複合体を作り、FGF23 のシグナル伝達に必須であることを示した (共同研究者の浦川)。一方、野生型マウス、 β -Klotho ノックアウトマウスに FGF19 を投与し、Cyp7A1 の発現抑制 (肝臓)、Egr1 の発現誘導 (各種臓器) を解析したところ、野生型では Cyp7A1 の発現が抑制され、Egr1 の発現が肝臓でのみで顕著に誘導されたが、ノックアウトマウスでは Cyp7A1 の発現抑制、Egr1 の発現誘導が起こらないことを確認した。これらの結果から FGF19 のシグナル伝達には β -Klotho が必須であることが示された。又、このシグナル伝達は JNK のリン酸化を介していた。次いで、FGF21 に付いての解析を行っている。

(2) α -Klotho と Na⁺, K⁺ATPase が結合しており、 α -Klotho · Na⁺, K⁺ATPase 複合体は ER, Golgi で見いだされ、Endosome 分画に蓄積していた。細胞外カルシウム濃度の低下に素早く応答して Na⁺, K⁺ATPase の細胞表面へのリクルートが誘導され、Na⁺, K⁺ATPase の機能が亢進する。この応答は α -Klotho に依存しており、Na⁺, K⁺ATPase の細胞表面へのリクルートと α -Klotho 蛋白の分泌が同時に起こり、相関していた。これらの事実から細胞外のカルシウム濃度が低下すると、その低下を細胞表面に存在するチャンネルが感知し、そのシグナルを α -Klotho · Na⁺, K⁺ATPase 複合体に伝え、 α -Klotho · Na⁺, K⁺ATPase 複合体を運ぶ Endosome の細胞表面へのリクルート、並びに α -Klotho 蛋白の膜貫通ドメイン、あるいはその近傍での切断、Na⁺, K⁺ATPase との解離がおこり、Na⁺, K⁺ATPase の細胞表面へのリクルートと α -Klotho の分泌がおこることが示された。ついで、Na⁺, K⁺ATPase が作り出す Na⁺ の濃度勾配、膜電位の変化に応答して腎臓でのカルシウムの再吸収、脈絡膜を介した脳脊髄液のカルシウム濃度の制御、上皮小体での PTH の分泌を制御していることが示唆された。一方、 α -Klotho は FGF23 が 1 α -hydroxylase の発現を抑えるシグナル伝達に関与

しており、結果としてビタミンD合成を負に制御していることが明らかとなった。又、ビタミンDの合成更新が多彩な変位表現型の主要な原因であることが明らかとなり、 α -Klotho はカルシウム恒常性を制御する中心的な因子であるとの結論に到達した。

(3) 膵臓の acinal cell における β -Klotho の機能を解析する目的で CCK の投与による膵液の分泌誘導について検討したが、分泌する膵液量、代表的な消化酵素類の分泌に変化が観察されなかった。

(4) NIH と共同で血液、尿、糞、肝臓、膵臓、脂肪、筋肉等の臓器のメタボローム、プロテオーム解析を開始した。

(5) β -Klotho の遺伝子多型を解析している。なお、本研究では、臨床グループが京都大学倫理委員会に申請し、承認された血液サンプルのみを使用した。一方、ヒト血清 α -Klotho 濃度を測定するエライザキットを確立して、健常人のボランティアから測定を開始した。

2. 研究実施内容

(1) Klothoファミリーと循環するFGF群によってコレステロール/胆汁酸、グルコース、カルシウム代謝が制御される機構

α -Klotho を発現させると FGF23 のシグナルが入り、 β -Klotho を発現させると FGF19, FGF21 のシグナルが伝わる解析システムを確立した。ついで、 α -Klotho が FGF1 (IIIc) と複合体を作り、FGF23 のシグナル伝達に必須であることを示した (共同研究者の浦川)。一方、野生型マウス、 β -Klotho ノックアウトマウスに FGF19 を投与し、Cyp7A1 の発現抑制 (肝臓)、Egr1 の発現誘導 (各種臓器) を解析したところ、野生型では Cyp7A1 の発現が抑制され、Egr1 の発現が肝臓でのみ顕著に誘導されるが、ノックアウトマウスでは Cyp7A1 の発現抑制、Egr1 の発現誘導が起こらないことを確認した。これらの結果から FGF19 のシグナル伝達には β -Klotho が必須であることが示された。又、このシグナル伝達は JNK のリン酸化を介していた。また、 β -Klotho ノックアウトマウスでは小腸における FGF15 (ヒト FGF19 のマウスホモログ) の発現が更新していた。

引き続き、FGF15、 β -Klotho、Cyp7A1 の発現に影響を与える因子の解析を行っており、 β -Klotho の生理的な機能の解明に結びつける。

FGF21 がグルコース代謝の制御に関わるとの報告があり、培養細胞を用いた解析系では、そのシグナル伝達に β -Klotho が必須であるとの結果を得たので、野生型、ノックアウトマウスを用いて血糖値の制御における FGF21、 β -Klotho の役割の解析を始めた。

(2) β -Klotho が膵臓の acinal cell において素早い応答を制御する機構の研究

β -Klotho は膵臓の acinal cell で発現している。acinal cell は食事摂取に速やかに反応して消化酵素を分泌する細胞であり、素早い応答における β -Klotho の機能を解析する目的で CCK の投与による膵液の分泌誘導について検討した。しかし、野生型と β -Klotho ノックアウトマウスの間で分泌する膵液量、代表的な消化酵素類の分泌に変化が観察されておらず、別の角

度からの解析を検討している。

(3) β -Klothoノックアウトマウスのコレステロール/胆汁酸代謝産物のメタボローム解析とそれらの生理活性、薬理作用の解析

NIHの共同研究者の研究室にポストドクをを派遣しており、血液、尿、糞、肝臓、膵臓、脂肪、筋肉、小腸、大腸等の臓器サンプルを送り、メタボローム、プロテオーム解析を開始した。

(4) 詳細な α -Klotho/Na⁺, K⁺ATPaseシステムの機能解析

α -KlothoはNa⁺, K⁺ATPaseと結合している。Na⁺, K⁺ATPaseの活性(K⁺取り込み能を示す⁸⁶Rbの取り込み)、及び細胞表面量(特異的リガンドである³Hウアバインの結合量)を解析し、細胞外カルシウム濃度の低下に素早く応答してNa⁺, K⁺ATPaseの細胞表面へのリクルートが誘導され、Na⁺, K⁺ATPaseの機能が亢進する。この応答は α -Klothoに依存している。また、 α -Klotho蛋白は膜貫通ドメイン近傍で切断されて分泌されるが、Na⁺, K⁺ATPaseの細胞表面へのリクルートと α -Klotho蛋白の分泌が同時に起こり、関連していた。細胞内輸送プロセスを解析して α -Klotho・Na⁺, K⁺ATPase複合体はER, Golgiで見いだされ、Endosome分画に蓄積していた。これらの事実から細胞外のカルシウム濃度が低下すると、その低下を細胞表面に存在するチャンネルが感知し、そのシグナルを α -Klotho・Na⁺, K⁺ATPase複合体に伝え、 α -Klotho・Na⁺, K⁺ATPase複合体を運ぶEndosomeの細胞表面へのリクルート、並びに α -Klotho蛋白の膜貫通ドメイン、あるいはその近傍での切断、Na⁺, K⁺ATPaseとの解離が起こり、Na⁺, K⁺ATPaseの細胞表面へのリクルートと α -Klothoの分泌がおこることが示された。ついで、 α -Klotho蛋白は細胞外カルシウム濃度の低下に素早く応答してNa⁺, K⁺ATPaseの細胞表面へのリクルートを制御しており、Na⁺の濃度勾配、膜電位の変化に応答して腎臓でのカルシウムの再吸収、脈絡膜を介した脳脊髄液のカルシウム濃度の制御、上皮小体でのPTHの分泌を制御していることが示唆された(Science in press)。一方、 α -KlothoはFGF23が1 α -hydroxylaseの発現を抑えるシグナル伝達に関与しており、結果としてビタミンD合成を負に制御していることが明らかとなった。又、ビタミンDの合成更新が多彩な変位表現型の主要な原因であることが明らかとなり、 α -Klothoはカルシウム恒常性を制御する中心的な因子であるとの結論に到達した。

これらの結果をこれまで知られているカルシウム制御機構のスキームの中に位置づけた。カルシウムホメオスタシスの制御は時間軸にそって大きく次の3つのステップに分けられる。

(1) 第1は瞬時の応答であり、細胞外カルシウム濃度の低下に伴うカルシウムの再吸収、脳脊髄液への輸送、PTHの分泌がこれに相当する。次いで、(2) 分泌されたPTHが骨からカルシウムを放出させる反応、腎尿細管でのカルシウム再吸収、ビタミンD合成を促進する反応が起こるが、これは数時間にわたる応答である。(3) 第3の反応はビタミンDによる小腸からのカルシウムの吸収や腎尿細管でのカルシウム再吸収であり、数時間から一日を超える反応である。これらの応答は時間軸にそった多段階の反応からなっており、複雑な相互作用、フィードバック機構によって制御されており、全体として血液・体液、脳脊髄液のカルシウム濃度は極めて狭いレンジに保持される仕組みとなっている。

(5) 臨床応用に向けた研究

ゲノム解析センターグループ、臨床研究科と共同で β -Klotho の遺伝子多型解析をスタートさせた。まず、アミノ酸をコードする部分を中心に遺伝子多型を解析し、次いで、糖尿病との連鎖から解析を進めている。なお、本研究では、臨床グループが京都大学倫理委員会に申請し、承認された血液サンプルのみをしようした。一方、ヒト血清 α -Klotho 濃度を測定するエライザキットを確立して、健常人のボランティアから測定を開始した。次いで、カルシウム代謝異常患者の血清の解析を行う。

3. 研究実施体制

(1) 鍋島 陽一「京都大学」グループ

研究項目

- ・ α -Klotho、 β -Klotho と FGF19,21,23 による新たな代謝応答システムの研究

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Urakawa I., Yamashita Y., Shimada T., Iijima K., Hasegawa H., Okawa K., Fijita T., Fukumoto S., Yamashita T. Klotho converts canonical FGFreceptor into a specific receptor for FGF23. **Nature** 444, 770-774 (2006)
- Sato A., Hirai T., Imura A., Kita A., Iwano A., Muro S., Nabeshima Y., Suki B., Mishima M. Morphological mechanism of the development of pulmonary emphysema in klotho mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 104(7) 2331-2336 (2007)
- Imura A., Tsuji Y., Murata M., Maeda R. Kubota K., Iwano A., Obuse C., Togashi K., Tominaga M., Kita N., Tomiyama K., Iijima J., Nabehsima Y., Fujioka M., Asato R., Tanaka S., Kojima K., Ito J., Nozaki K., Hashimoto N., Ito T., Nishio T., Uchiyama T., Fujimori T., Nabehsima Y.
 α -Klotho as a regulator of Calcium homeostasis. **Science** in press