「代謝調節機構解析に基づく細胞機能の制御基盤技術」
平成18年度採択研究代表者

Ｈ２２年度
実績報告

鍋 島 陽 一
先端医療振興財団先端医療センター・センター長

「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

α-Klotho、β-Klotho、FGF19 subfamily による生体恒常性維持機構の全体像の解析を進め、α-Klotho、FGF23、1,25(OH)2D,PTH から成る電解質代謝の全体像、β-Klotho、FGF19、胆汁酸からなるコレステロール／胆汁酸代謝の全体像を明らかにした。α-Klotho KO、β-Klotho KO、及び、FGF21 KO マウスの解析により FGF21 のシグナル伝達には第3の Klotho 様因子が必用であることを示唆した。

α-KlothoとFGF23をモデルに結合様式を解析し、FGF23に結合している新規の糖鎖配列をα-Klotho の酵素活性中心が認識し、FGF23/α-Klotho/FGFR1 複合体が形成され、FGF23 シグナルが伝達されることを明らかにした。これらの結果よりα-Klotho は新規レクチンであると結論された。また、α-Klotho は FGF23 の 178 番目のスレオニンに結合している糖鎖と結合しており, その構造を決定した（投稿中）。次いで FGF19 の糖鎖結合部位、糖鎖構造の解析を開始している。

Surface plasmon resonance 解析法による分子間相互作用の解析、原子間力顕微鏡による α-Klotho/FGF23/ FGFR1 複合体の構造観察を行い、FGF23 シグナル伝達におけるα-Klotho の役割とその分子機構を示すモデルを提案した(投稿中)。

β-Klotho に対するモノクローナル抗体を分離し、免疫沈降、Mass によりβ-Klotho 結合タンパクの候補をリストした。同時に脂肪細胞の初代培養システムによりβ-Klotho の機能を解析するシステムを立ち上げた。また、高脂肪食飼育により野生型は高度な肥満が誘導されるが、β-Klotho KO マウスでは顕著な肥満が起こらないことを確認した。
更に、β-Klotho ノックアウトマウスの寿命曲線は野生型マウスの寿命曲線と変わらないことを確認した。

α-Klotho KO、β-Klotho KO、WT の尿、血液、糞等のメタボローム解析を行い、ノックア

ウトマウスと野生型で顕著に差異のある複数のピークを見いだし、それらの構造解析を検討している。

分泌型α-Klothoを測定するキットを開発した。分泌型α-Klothoは新生児、幼児で高く、また、臍帯血では著しく高く、加齢に伴い減少する。更に、α-Klotho と血清 FGF23 値は逆相関していた。なお、本キットは昨年秋より販売を開始した。

これらの成果を基盤に、それぞれのステップの分子メカニズムの解明、α-Klotho, β-Klotho の機能制御に関連する新たな分子の同定、電解質、コレステロール／胆汁酸代謝、糖代謝を制御する新たな分子機構の解析へと展開している。最終的には、これらを統合して代謝応答制御を介した動物個体の生存戦略を明らかにしたいと考えている。

§2. 研究実施体制

(1)「鍋島」グループ

①研究分担グループ長(先端医療振興財団、先端医療センター、センター長)

②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**

(2)「小布施」グループ

①研究分担グループ長　(北海道大学生命科学院・教授)

②研究項目　**β-Klotho 結合蛋白、代謝制御に関わる細胞表面分子の同定についての研究**

(3)「鍋島」グループ

①　研究分担グループ長(京都大学医学研究科・名誉教授)

②研究項目　**脂肪細胞におけるβ-Klotho による新たな代謝応答システムの研究**

§3. 研究実施内容

1. 糖鎖認識・糖鎖結合分子としてのα-Klotho の機能

α-Klotho はβ-glycosidase のホモログであり、極めて弱いがβ-glucronidase 活性が確認されたことから、相手分子の糖鎖を認識し、結合、あるいは分解することがα-Klotho の本質的な機能ではないかと推定し、α-Klotho による FGF23 シグナル伝達の制御系をモデルとしてこの仮説を検証した。その結果、FGF23 の 178 番目のスレオニンに結合する *O*-linked 糖鎖(T178 糖鎖)が極めて重要な糖鎖であり、FGF23 のシグナル伝達制御を担っていることが明らかとなった。次いで、FGF23 を大量に合成し、T178 糖鎖を含むペプチドを HPLC で精製・濃縮し、MALDI-TOF Mass Spectrometry.により糖鎖構造を決定した。

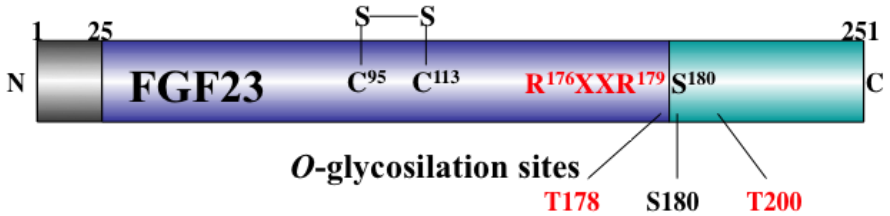
T178 糖鎖構造は高等真核生物の *O*-linked 糖鎖から初めて見出された構造であったことから、推定された T178 糖鎖構造を化学合成し, Mass Spectrometry により解析し、T178 に結合する糖鎖と同一のパターンをとる事を確認した。また、FGF23 に結合している糖鎖をヒドラクラブで調整し、その構造を解析し再確認した。更に、特異的糖鎖構造を認識する抗体による解析、

α-Klotho が結合する糖鎖構造の特徴を解析し，T178 糖鎖をα-Klotho の酵素活性中心様構造が認識し、結合する事を明らかにした。また，化学合成した T178 糖鎖が競合阻害により α-Klotho と FGF23 結合を阻害し、FGF23 のシグナル伝達を阻害することを見出した。また、FGF23 は FGF ファミリーに共通の配列に加えて C 末端側に Extra-Domain を持っており、この C 末ドメインもα-Klotho と FGF23 の結合に重要な役割を担うことが確認された（図1）。

これらを総合して、α-Klotho は T178 糖鎖と周辺のペプチド配列によって作り出された特異構造を認識・結合することによって FGF23 のシグナル伝達を制御しており、α-Klotho は新規レクチンであり、糖鎖と結合することにより分子間相互作用を担う分子として機能していると提唱した（投稿中）。

FGF23 の T178 糖鎖はα-Klotho の 酵素活性中心様構造に結合することによって α-Klotho と FGF23 の結合を強め、安定化させる。よって、循環している FGF23 はα-Klotho に効率よくトラップされ、腎臓に集積.する。形成されたα-Klotho/FGF23 複合体はα-klotho と FGFR1 の結合を介して FGF23/α-Klotho/FGFR1 複合体を形成する（FGF23 は FGFR1 に直接結合できない）。更に、T178 糖鎖を欠失すると FGF23 のα-Klotho との結合能が低下し、FGF23 の腎臓への集積が減少すること、一方、*α-klotho*$^{-/-}$マウスでは FGF23 は殆ど腎臓に集積しないこと、T178 糖鎖を欠失した FGF23 は生理的濃度ではシグナルを伝達出来ないこと等を

図1　FGF23の糖鎖修飾と糖鎖の機能



糖 鎖 の 機 能

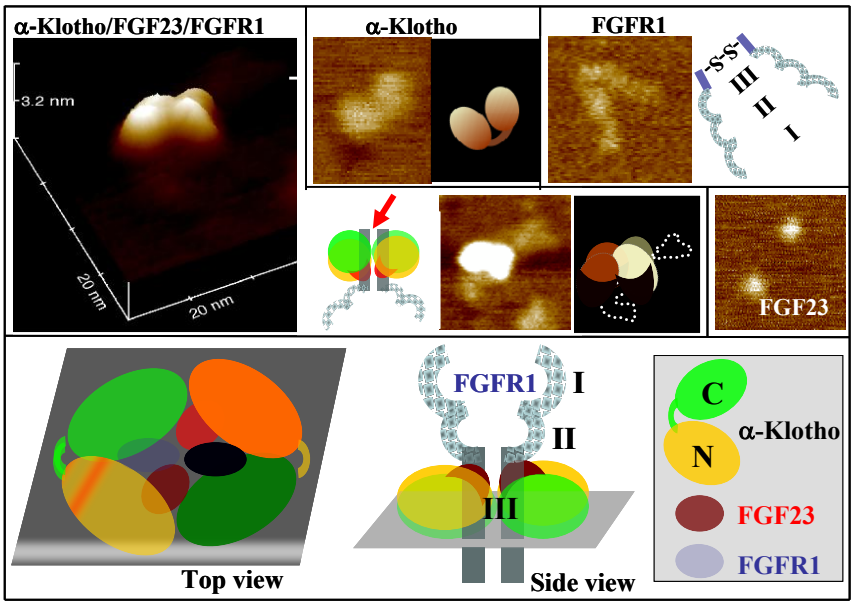
FGF23^{Thr178}	FGF23の腎臓への集積に必要 FGF23の腎臓への集積はα-Klothoに依存している α-KlothoノックアウトではFGF23は腎臓に集積できない α-KlothoとFGF23の結合を強化・安定化に寄与 FGF23の生理的ドーズでのシグナル伝達に必須
FGF23^{Thr200}	FGF23の血液中での安定性、分解からの保護
FGF23^{Ser180}	機能は不明

確認し、T178 糖鎖がα-Klotho と FGF23 の結合を促進、安定化させることの重要性を明らかにした。また、T200 に結合する糖鎖が血液中における FGF23 の分解を抑えていることも明らかとなった（図1）。

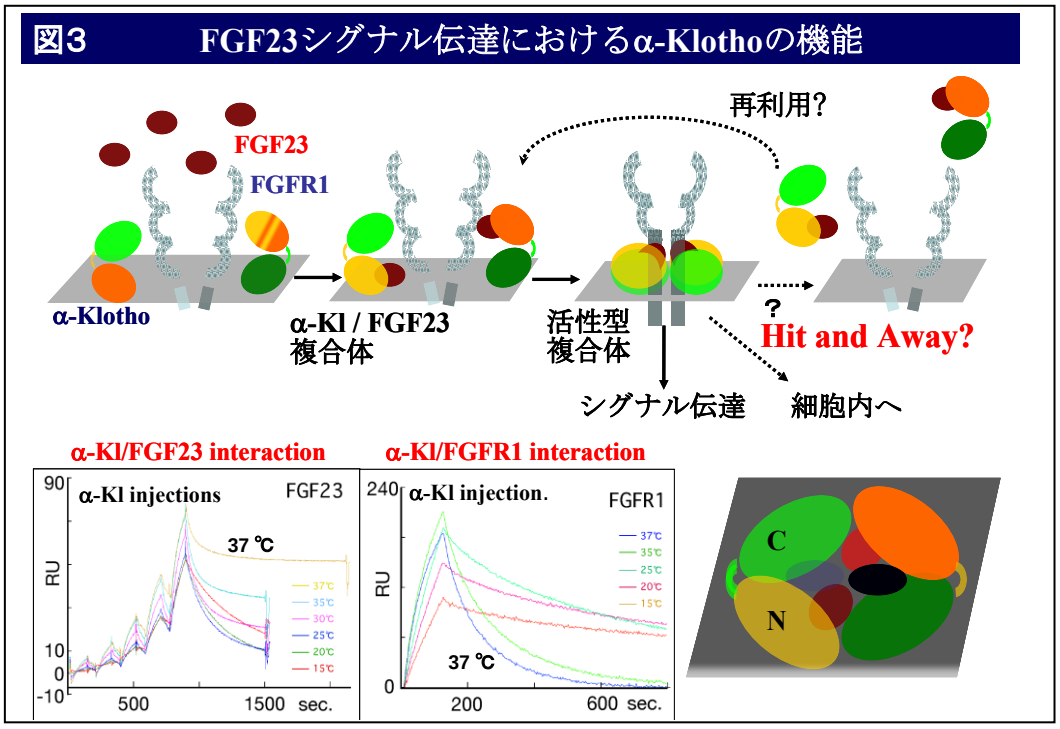
2. α-Klotho が FGF23 シグナル伝達を制御するモデルの提案

原子間力顕微鏡によるα-Klotho/FGF23/FGFR 複合体の構造観察を行い、構造モデルを提案した（図2)。FGF23/α-Klotho/FGFR1 複合体においては、2個の FGFR1 は相向かいあって2量体を形成していると考えられておりα-Klotho/FGF23 複合体は互い違いに向き合い、FGFR1 に結合していると推定される。また、得られた画像は、FGFR1 の細胞膜ドメインの直ぐ N 端側の IIIc ドメインにα-Klotho/FGF23 複合体が結合すること、2個のα-Klotho/FGF23 複合体の4つの Glycosidase 様ドメインがリングを作り、2個の FGFR1 を取り巻くことによって FGFR1 を二量体化（活性化）していることを示している。更に、ヒトα-Klotho の N 端側ドメインの変異体は FGF23 に結合できないが FGFR1 に結合できることから、FGF23 は N 端側ドメインに結合し、C 端側ドメインにより FGFR1 に結合して活性型複合体を形成していると推定され、これらの事実を総合してモデルを提案した。

図2　AFMによるα-Kl/FGF23/FGFR1複合体の構造解析



ついで、表面プラズモン解析法による分子間相互作用の解析結果、変異マウスの解析結果等を総合して FGF23 シグナル伝達におけるα-Klotho の役割とその分子機構を示すモデルを提案した(図2)。この一連の反応においてα-Klotho は FGF23 の糖鎖と結合する足場タンパク（レクチン）として機能し、FGF23（リガンド）と FGFR1（受容体）を繋ぐ橋渡し役を演じる。なお、37℃では FGF23 とα-Klotho の結合は極めて安定であるが、一方、α-Klotho は FGFR1 に速やかに結合するが、FGFR1 から速やかに解離することが示唆され、FGF23/α-Klotho/FGFR1 複合体が形成され、FGFR1 が活性化されるとα-Klotho/FGF23 複合体が FGFR1 から速やかに離れると推定されている(図3)。



2. β-Klotho、FGF19による脂質代謝制御

脂質は生体の主要な熱源であり、また必須脂肪酸の摂取は生体の機能維持に不可欠である。食物中の脂質は①胆汁酸の作用でミセル化され、②膵リパーゼの作用により加水分解されて、③腸管上皮から吸収される。これまで我々は、主として回腸から分泌されるFGF19が肝臓においてβ-KlothoとFGFR4を受容体として作用し、肝臓におけるコレステロールからの胆汁酸合成の律速酵素Cyp7a1の転写レベルを調節することを明らかにした(Tomiyama et al. PNAS, 2010)。しかしFGF19には転写を介する緩徐な作用に加えて急速な代謝調節作用があると考えられることから、今回われわれはFGF19の投与実験を行い、急性期の胆汁脂質組成変化の解析を行った結果、FGF19は総胆管内での脂質加水分解活性を増加させると考えられた。そこで純粋胆汁と膵液を分けて回収し、胆汁中の脂質と膵液中タンパク質の解析を行い、純粋胆汁中の脂質組成には変化が認められなかったのに対し、膵液ではFGF19投与後60分からはじまり約90分でピークに達する、リパーゼ活性の増加が認められた(約3－4倍)。このリパーゼ活性増加は膵液量の変化を伴わず、膵液タンパク質濃度の約2倍の増加を伴った。 膵液タンパク質組成を変化させるホルモンとしてこれまでにコレシストキニン(CCK)が知られる。FGF19はCCK(静脈内投与後数分からはじまり約10分でピーク)よりも遅いタイムコースでリパーゼ活性を増加させること、上部小腸から分泌されるCCKと異なり回腸末端に多く発現することから、FGF19とCCKは個体の脂質恒常性維持において異なった生理的意義を有すると考えられる。本研究により膵外分泌機能を調節する新しいホルモンとしてのFGF19の意義が明らかになると同時に、FGF19/β-Klothoシステムが緩徐な胆汁酸合成調節作用に加えて急速な膵リパーゼ分泌調節機序を介して、個体の脂質吸収を統合的に制

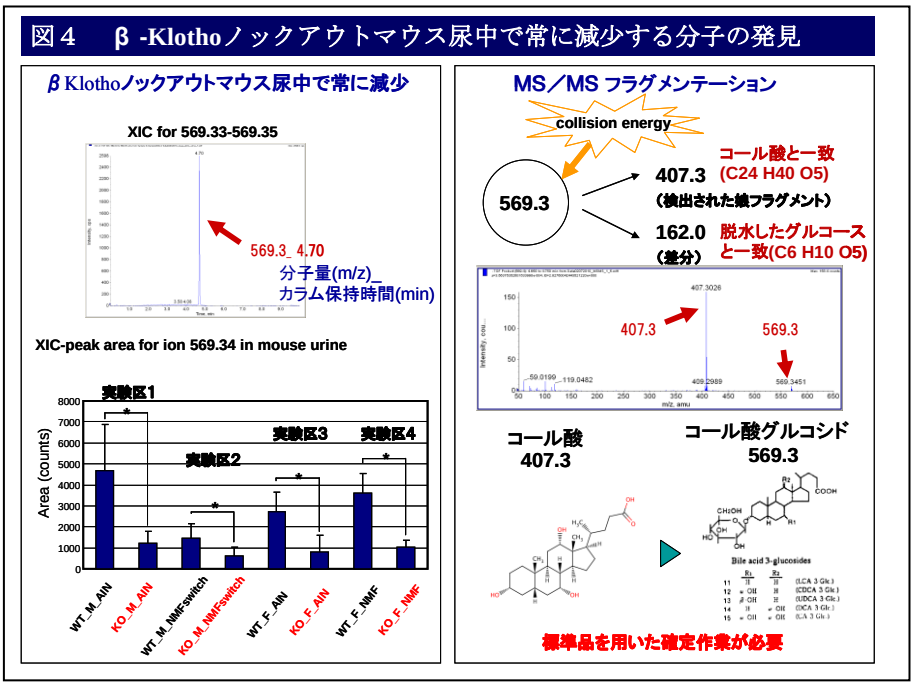
御することが明らかとなった。 食物として摂取された脂質は胆汁酸によるミセル化、膵リパーゼによる加水分解を受けた後に腸管から吸収され、最終的には脂肪組織に貯蔵される。この経路の中でβ-Klothoは少なくともミセル化、加水分解の二つのステップを制御していることが明らかとなった。脂肪組織にも高レベルに発現するβ-Klothoの細胞生理学的機能を解明することにより、個体の脂質代謝制御の新規パラダイムの提唱を目指す。

3. ヒトα-Klotho 変異の同定、ヒトα-Klotho 血清値測定システムの開発

キリンビールと協力して、ヒト分泌型α-Klotho を測定するサンドイッチエライザ系を開発し、乳幼児から高齢者にいたる各年齢層のα-Klotho の血清濃度、並びに関連する FGF23、リン、カルシウム、PTH、ビタミン D などの濃度を測定した。α-Klotho は乳幼児、小児で高く、加齢に伴い低下し、FGF23 の血清値と逆相関していた。また、α-Klotho は胎盤でも発現しており、臍帯血のα-Klotho 濃度は顕著に高く、一方、FGF23 の濃度は極めて低いことも明らかとなった。血清に存在する分泌型α-Klotho の機能は未だ不明であるが、各種疾患における血清α-Klotho 値の測定が進行している。なお、本キットは昨年10月より実験試薬として販売され、世界的に利用されつつある（BBRC,2010）(J. Clin. Endocri. Metab. 2011)

4. α-Klotho、β-Klotho、WT の尿、血液、糞等のメタボローム解析

解析対象を分子量が1000以下の分子に絞り、ノックアウトマウスと野生型で顕著に差異のある分子を解析し、β–Klotho ノックアウトマウスの尿中で飼育、栄養条件に関わらず低下している分子を見出した。当該分子はコール酸グルコシドと推定され、化学合成により確認と合成化合物による機能解析を実施中である。（図4）



5. 本研究の意義

動物個体は、電解質や脂質を体外（尿、消化管）へ排出し、必要な量を再吸収（回収）することを繰り返すことによってその量と質を保っている。この仕組みに「食事からの吸収」と「体内組織からの動員」が連動し、全体のバランスを取ることによって恒常性が維持されている。恒常性の維持は「生理機能、健康、病態、老化」の基盤を成す機構であり、近年、その研究の重要性が再認識され、「代謝制御、生活習慣病、老化・寿命制御を繋ぐ新たな領域」として大きく発展しつつある。α-Klotho、β-Klotho はまさにこの恒常性を維持する機構の統合的制御を担う新たな分子であり、Klotho family の分子機能の解明により全く新しい制御機構の解明、新たな創薬シーズの開発へと研究が進んできた。ここに Klotho family の発見とその機能解明の今日的意義、重要性がある。

§4. 成果発表等

（4－1） 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Ohata Y., Arahori H., Namba N., Kitaoka T., Hirai H., Wada H., Nakayama M., Michigami T., Imura A., Nabeshima Y., Yamazaki Y., Ozono K. Circulating lavels of soluble alpha-Klotho are markedly elevated in human umbilical cord blood. **J. Clin. Endocri. Metab.** 2011 PMID21411554

2. Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, Shimada T, Murakami J, Aono Y, Hasegawa H, Yamashita T, Nakatani K, Saito Y, Okamoto N, Kurumatani N, Namba N, Kitaoka T, Ozono K, Sakai T, Hataya H, Ichikawa S, Imel EA, Econs MJ, Nabeshima Y. Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 398(3):513-8 (2010) PMID 20599764

3. Tomiyama K., Maeda R., Urakawa I., Yamazaki Y., Tanaka T., Ito S., Nabeshima Y., Tomita T., Odori S. , Hosoda K. , Nakao K., Imura A., Nabeshima Y. Relevant use of Klotho in FGF19 subfamily signaling system *in vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 107; 1666-1671 (2010) PMID 20080590