

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：代謝応答を統御する新たな分子機構の研究

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点):

研究代表者

鍋島 陽一 ((財)先端医療振興財団先端医療センター センター長)

主たる共同研究者

小布施 力史 (北海道大学大学院生命科学院 教授)

3. 研究実施概要

α -Klotho、 β -Klotho は発現細胞における結合分子の機能制御、FGF23、FGF15/19 のシグナル伝達制御に関わっており、 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、NaK-ATPase 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。更に 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提唱し、ヒト FGF21 を発現する Tg マウスを作成し、FGF21 と結合する分子の存在を示す結果を得た。

α -Klotho、 β -Klotho はそれぞれ複数の分子と結合しているが、 α -Klotho と FGF23 の相互作用をモデルに結合様式を解析した。FGF23 の Thr178 に結合している糖鎖配列を α -Klotho の酵素活性中心様構造が認識し、安定な結合をもたらす、循環している FGF23 は α -Klotho に効率よく腎臓に集積する。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 複合体を形成し、FGF23 シグナルを伝達する (FGF23 は FGFR1 に直接結合できない)。また、 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確認した。

FGF23 の 178 番目のスレオニンに結合している糖鎖の構造を解析し、T178 糖鎖構造を決定した。次いで、化学合成した T178 糖鎖を用いて FGF23 と α -Klotho の結合様式を解析し、(1) T178 糖鎖は FGF23 の T178 に結合していなくとも機能すること、(2) T178 糖鎖が α -Klotho に結合する事によって α -Klotho のアロステリックコンホメーション変化が誘導され、糖鎖を持たない naked FGF23 と α -Klotho の安定な結合がもたらされることを示唆する結果を得た。この仮説を証明するためには、 α -Klotho の結晶構造、 α -Klotho/T178 糖鎖の共結晶、 α -Klotho/FGF23 の共結晶の構造解析が必要であり、これらの分子の大量合成、結晶構造解析を進めている。

原子間力顕微鏡、Surface plasmon resonance 解析法による分子間相互作用の解析による 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構築した。すなわち、FGF23/ α -Klotho/FGFR1 複合体は6量体を形成しており、 α -Klotho/FGF23 複合体は互い違いに向き合い、FGFR1 の細胞膜ドメインの N 端側の IIIc ドメインに結合していること、2個の α -Klotho 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)していることを提案した。この一連の反応において α -Klotho は FGF23(リガンド)と FGFR1(受容体)を繋ぐ橋渡し役を演じている。

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 結合タンパクをリストした。脂肪細胞の初代培養システムに脂肪、アミノ酸、各種ホルモン等を投与し、結合因子の細胞表面への移動を

制御する機構を解析している。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ており、 β -Klotho 結合因子の機能解析を含めて脂質代謝における β -Klotho の役割を解析している。また、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。

α -Klotho の血中濃度が健常人の10倍程度存在する小児患者を発見した。患者は電解質代謝異常を示しており、 α -Klotho ノックアウト変異表現型の逆の症状を示しており、ヒトにおいても α -Klotho は電解質代謝を制御していることが示された。

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。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

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) $_2$ D、PTH、NaK-ATPaseからな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、更にFGF21のシグナル伝達機構の解析から第3のKlotho様分子が存在することを明らかにした。また、 α -KlothoとFGF23の結合様式を解析し、 α -KlothoはFGF23のThr178残基に結合した糖鎖を認識してFGF23と結合し、FGFR1と複合体を形成することによってFGF23のシグナルを伝達することを明らかにした。現在、 α -Klotho/FGF23複合体の結晶構造解析が行われつつある。これは糖鎖の新しい機能を解明したものであり、高く評価できる成果である。 α -Klothoに関しては、分泌型 α -Klothoの測定キットを開発し、分泌型 α -Klothoは新生児、幼児で高く、加齢に伴い減少することを明らかにし、また分泌型 α -Klotho過多の小児患者の発見がなされた。一方、 β -Klothoノックアウトマウスのメタボローム解析、 β -Klotho結合蛋白の同定と機能解析など、現時点で完成度の高い成果となっていない部分も存在する。

当該研究機関での論文発表はやや遅れがちであるが、糖鎖を介する α -KlothoとFGF23との結合に関する研究は極めて優れた研究成果であり、レベルの高いジャーナルでの発表が期待できる。分泌型 α -Klothoの測定キットを開発し、販売開始に至っているが、本研究課題に関連する成果について特許出願されたものはない。糖鎖を介する α -KlothoとFGF23との結合を制御する薬物の開発は今後期待できるところである。

4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

α -Klotho の発見者鍋島代表による独創的な研究であり、この領域を世界でリードしていることは明らかである。カルシウム代謝を三つの時間スケールにおける複層的な制御機構で理解する成果が得られつつあり、教科書レベルの基本的事項にも変更を迫るレベルの高い研究であり、学術的インパクトは極めて大きい。FGF23 の糖鎖の α -Klotho による識別が α -Klotho の構造変化を引き起こし、その後の作用に必要であるという結果は、構造解析に基づいてさらに明確にされれば、糖鎖の識別全般について新たな視野をもたらすインパクトある成果となる。このように代謝研究としては高く評価できるが、本研究領域が目指すメタボローム解析に基づく成果は現時点では僅かであり、今後の課題とされている。

4-3. 総合的評価

初期の研究計画がほぼ着実に実施され、 α -Klotho、 β -Klotho と FGF19 subfamily による生体恒常性維持機構に関し広範な研究が行われ、 α -Klotho が糖鎖認識をすることや、FGF21 には、 α -Klotho、 β -Klotho とは異なる分子が関与することを示唆する新たな優れた成果を挙げている。特に、 α -Klotho と FGF23 の結合様式を解析し、 α -Klotho は FGF23 の Thr178 残基に結合した糖鎖を認識して FGF23 と結合し FGFR1 と複合体を形成することによって FGF23 のシグナルを伝達することを示した成果は高く評価できるものである。FGF23 に結合する糖鎖の構造決定を自身の研究室で完成させた点も特筆に価する。これはメタボローム解析からの直積的な成果ではないが、本領域が目指すメタボローム研究から派生した成果であり、本領域を代表する優れた研究成果の一つとして位置付けられる。第三の Klotho 分子の解析、 β -Klotho ノックアウトマウスのメタボローム解析、 α -Klotho/FGF23 複合体の結晶構造解析、 α -Klotho と FGF23 との結合を制御する薬物の開発など、今後さらに発展する研究が継続されており、インパクトの高い研究成果が期待できる。