

鍋島 陽一

京都大学大学院医学研究科・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

$\alpha$ -Klotho、 $\beta$ -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、 $\alpha$ -Klotho、FGF23、1, 25(OH)2D, PTH から成る電解質代謝の全体像、 $\beta$ -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。 $\alpha$ -Klotho KO、 $\beta$ -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。

$\alpha$ -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 $\alpha$ -Klotho の酵素活性中心が認識し、FGF23/ $\alpha$ -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。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。

$\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -Klotho の機能を解析するシステムを立ち上げた。その結果、脂肪酸が常時、肝臓から消化管に放出され、その再吸収を制御することにより、その恒常性を制御していることが示唆され、このシステムを FGF19/ $\beta$ -Klotho システムがポジティブに制御していることが示唆され、全く新しい展開となっている。

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、 $\beta$ -Klotho KO マウスでは顕著な肥満が起らないことを確認した。

$\alpha$ -Klotho KO、 $\beta$ -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。

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、 $\alpha$ -Klotho、 $\beta$ -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: 鍋島 陽一 (京都大学大学院、教授)

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: 小布施 力史 (北海道大学大学院、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

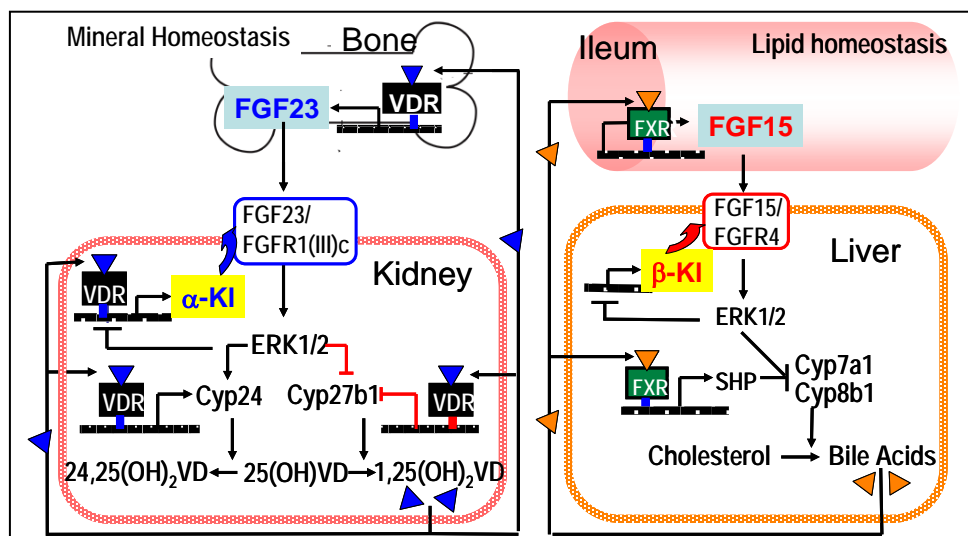
## § 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

1. □Klotho、□□ Klotho FGF19 subfamily□による生体恒常性維持機構の全体像を解明する為、in vivoにおける□Klotho、□□ Klothoと FGF19,FGF21,FGF23、FGF受容体との結合、リン酸化カスケード、ターゲット遺伝子の発現を解析、Klotho family、FGF19 subfamily のフィードバック作用の検討を行い、□Klotho、FGF23、1,25(OH)<sub>2</sub>D、PTH から成る電解質代謝の全体像、□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(図1)(発表論文2、発表論文3)。なお、□Klothoは FGF21 のシグナル伝達に必須ではなく、第3の未知の因子の存在が推定された。京都大学薬学部伊藤研究室より FGF21 ノックアウトマウスが分与されたので、その解析を併せて行い、第3の因子、FGF21 のターゲット遺伝子の同定を進める。

ビタミンDの顆粒でチオレドキシンの発現が上昇し、酸化ストレスの亢進をもたらす可能性が示唆され、共同研究により検討した(発表論文1)。

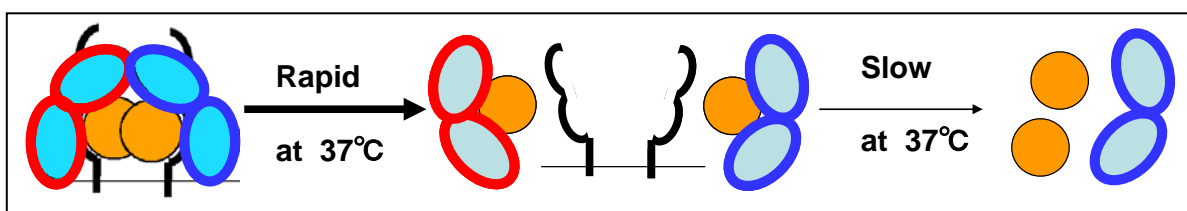
図1



2. FGF23 には3箇所の糖鎖結合配列 (O-linked) があり、それぞれの糖鎖結合配列に変異を導入し、糖鎖の意義を解析した。T<sup>200</sup> の糖鎖は血清中での分解を抑えることに機能しており、□□<sup>B</sup> の糖鎖は FGF23 の腎臓への集積に作用しており、この腎臓への集積は□Klotho□に依存していた。また、□Klotho と FGF23 の結合様式を解析し、FGF23 の 178 番目のスレオニンに O-グリコシド結合している糖鎖配列を□Klotho が認識し、強固な結合を形成し、FGF23/□Klotho/FGFR1 複合体が形成され、FGF23 のシグナルが伝達されることを明らかにした。また、Estrone-3□D-GlcU (特異的グルクロニダーゼ阻害剤)、あるいはグルクロン酸を添加すると □Klotho と FGF23 の機能的な結合が阻害され、FGF23 のシグナル伝達が阻害されるとの結果が得られ、□Klotho のグルクロニダーゼ酵素活性中心が FGF23 との結合の促進、安定化に関与していることが示唆された。また、□Klotho と FGF23 の結合は安定しているが、□Klotho と FGFR1 は素早く結合し、素早く解離することが明らかとなり、hit and away 機構によってシグナルを伝達することが示唆された(口頭発表 4,5, 投稿中)(図2)。この結果は、□Klotho は糖鎖認識タンパクとして機能すること、又、□Klotho は電解質代謝システムの進化(PTH、ビタミン D の出現、腎臓機能の飛躍的な進歩)と平行してグリコシダーゼファミリーから分子進化してきたとの推定をサポートするものである。なお、178 番目のスレオニンに結合している糖鎖配列にグルクロン酸が含まれていること(Mass 解析)が示唆されているが、更なる構造解析を理研の糖鎖構造生物学研究チームと共同で行っている。

これらの結果を総合すると、骨で合成された FGF23 が血流を介して腎臓の遠位尿細管に到達し、□Klotho との結合(トラップ)により腎臓に集積し、□Klotho・FGF23 複合体が形成され、FGFR1 に結合し、シグナルを伝え(FGFR1 のリン酸化)、速やかに FGFR1 より解離する仕組みが推定される。シグナルを伝達した後、速やかに□Klotho・FGF23・FGFR1 複合体が細胞内に取り込まれる可能性(Internalization)も否定できないが、得られた結果はその可能性が低いことをサポートする。□Klotho・FGF23 複合体は安定であり、この複合体が次の受容体の活性化(リサイクリング)に利用される可能性が考えられるが、今後の検討課題である。

図2



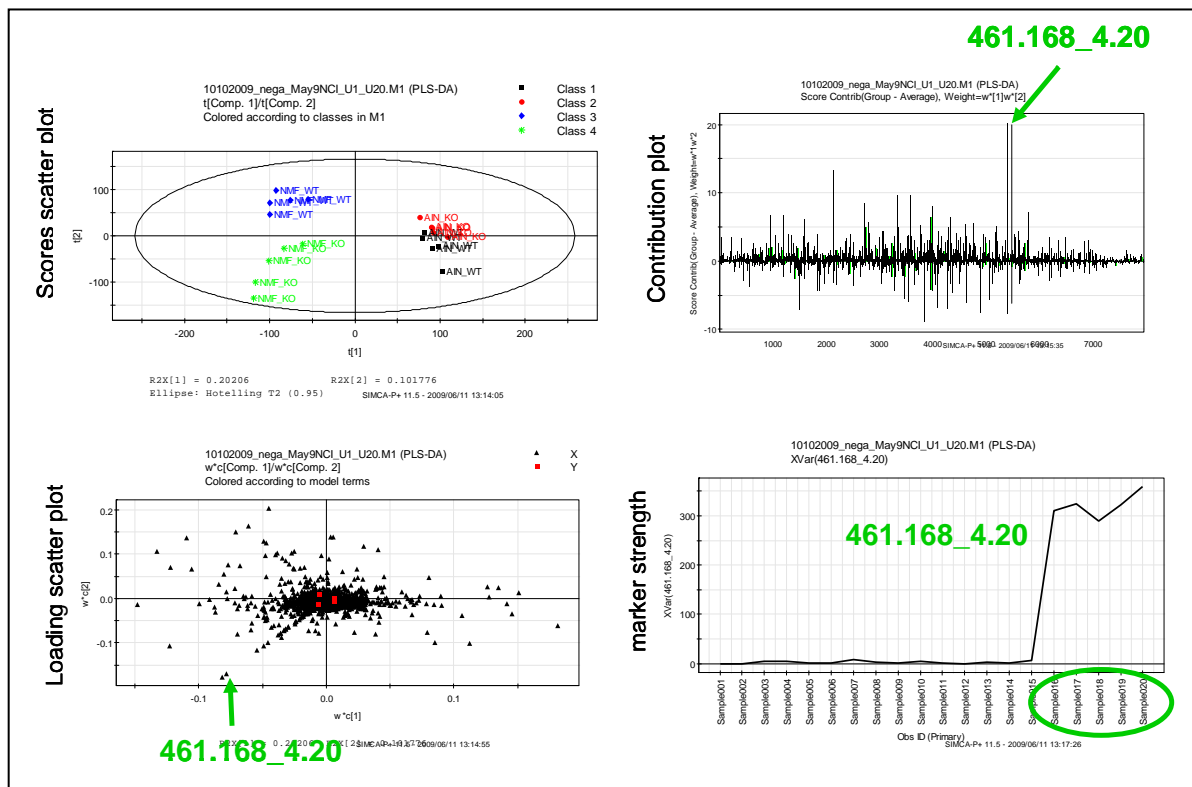
□Klotho に対する免疫沈降用のモノクローナル抗体を分離し、WT、□□ Klotho KOマウスの脂肪細胞より免疫沈降、mass による全ゲル解析を行い、□Klotho 結合タンパクの候補をリストした。又、WT、□□ Klotho KOマウスの肝臓細胞からも免疫沈降、mass による全ゲル解析を行い、結合タンパクを解析し、候補分子をリストした。一方、脂肪細胞の初代培養システムにより □Klotho の機能を解析するシステムを立ち上げ、脂肪酸、アミノ酸、糖等の添加に対する応答の

解析を始めた。これらを背景に、脂肪代謝、コレステロール代謝の恒常性維持機構に関する新しいコンセプトに到達したいと考えている。

3. □Klotho KO マウスは普通食飼育では脂肪量、脂肪細胞のサイズが野生型より若干亢進気味であるが、野生型に高度な肥満が誘導される高脂肪食で飼育しても顕著な肥満が起こらないことを報告していたが、次いで、血清の脂質代謝関連マーカー、肝機能、脂質代謝マーカー、食餌摂取量等を解析し、高脂肪食で飼育しても顕著な肥満が起こらない要因の解析を進めている。得られている事実は、□□ Klothoの機能を制御することが肥満、コレステロール代謝の改善につながる可能性を示しており、□Klotho の機能を抑える低分子化合物の同定を目指した共同研究を進めている。

□Klotho、□□ Klotho WT の尿、血液、糞等のメタボローム解析を行っている。当面の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複数のピークを見いだした(図3)。更に検討を進め、普通食飼育、高脂肪食飼育、性別に影響されることなく、絶えず□□ Klotho KO マウスで顕著に低下している分子を同定した。この分子は各種の条件に左右されることなく□□ Klotho KO マウスで顕著に低下していることから、□□ Klothoの機能欠失に深く関連している分子と推定され、質量分析の値から推定される分子の候補をリストし、可能性の高い分子の化学合成を進めており、分子構造を確定すると同時に、その機能解析を進める(図3)。

図3



4. キリンビールと協力してヒト血清  $\alpha$ -Klotho 濃度を測定するシステムを確立し、健常人の測定により正常値を決定した(投稿中)。臨床研究室と共同でカルシウム代謝異常患者、リン酸代謝異常患者の解析を継続する。また、腎不全患者、小児の解析についての共同研究も併せて行う。

5. 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、 $\alpha$ -Klotho,  $\beta$ -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. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. Okuyama H, Yoshida T, Son A, Oka S, Wang D, Nakayama R, Masutani H, Nakamura H, Nabeshima Y, Yodoi J. Thioredoxin binding protein 2 modulates natural killer T cell-dependent innate immunity in the liver: possible link to lipid metabolism. *Antioxid Redox Signal*. 11(10):2585-2593 (2009)

2. Nabeshima Y. Discovery of  $\alpha$ -Klotho unveiled new insights into calcium and phosphate homeostasis. **Proc. Jpn. Acad. Ser. B** 85, 125-141 (2009)

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 usage of Klotho in FGF19 subfamily signaling system *in vivo*  
**Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 107; 1666-1671 (2010)

4. Nabeshima Y. Role of klotho in the regulation of vitamin D and calcium homeostasis  
**Nature Review Nephrology** in Press