

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「代謝調節機構解析に基づく細胞機能
制御基盤技術」

研究課題
「代謝応答を統御する新たな分子機構の研究」

研究終了報告書

研究期間 平成18年10月～平成24年3月

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)

§ 1 研究実施の概要

(1) 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) していることを明らかにした。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。

α -Klotho KO の変異表現型である異所性石灰化、メンケベルグ型動脈硬化、肺気腫、皮膚の萎縮など症状は腎不全の合併症と酷似しており、その発症を抑える化合物を見いだすことができたことから、創薬への発展を目指している。

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、 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) 顕著な成果

1. Imura A., Tsuji Y., Murata M., Maeda R., Kubota K., Iwano A., Obuse C., Togashi K., Tominaga M., Kita N., Tomiyama K., Iijima J., Nabeshima Y., Fujioka M., Asato R., Tanaka S., Kojima K., Ito J., Nozaki K., Hashimoto N., Ito T., Nishio T., Uchiyama T., Fujimori T., Nabeshima Y. α -Klotho as a regulator of Calcium homeostasis. *Science* 316, 1615-1618 (2007) PMID 17569864

概要: α -Klotho はエンドソーム分画、ゴルジ体などの細胞内小器官において Na^+ , K^+ ATPase と結合しており、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、即ち機能亢進をもたらす。結果として Na^+ の濃度勾配、膜電位の変化を引き起こし、腎臓の遠位尿細管においてカルシウム再吸収の制御、脈絡膜における血液から脳脊髄液へのカルシウムの輸送、上皮小体におけるPTHの分泌を制御している事を示した。

2. 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

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) $_2$ D $_3$ PTH、 Na^+ -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た。

3. 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

概要: ヒト分泌型alpha-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alpha-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。alpha-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。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

1) α -Klotho, β -KlothoがFGF23, FGF19を認識し、シグナルを伝える仕組みの解明

α -Klotho、 β -KlothoがFGF23、FGF19のシグナル伝達制御にどのように関わるかを解明する事を目的としている。まず、 α -Klotho、 β -Klothoノックアウトの解析により、FGF23、FGF19のシグナル伝達には α -Klotho、 β -Klothoが必須であることを明らかにした。次いで α -Klotho、 β -KlothoがFGF23、FGF19と結合することを確認し、その結合様式の解明へと進めてきた。その過程でFGF23に結合している糖鎖が重要であることを突き止め、その構造解析、複合体形成、シグナル伝達における役割の解明へと進めた。次の課題としてFGF19(ヒト)・FGF15(マウス)がどのような翻訳後修飾を受けるか、その構造解析、機能解析を進めると同時に β -Klothoとの結合様式に付いて解析を進めてきた。現在、FGF19を高発現するヒト培養細胞を見だし、大量のFGF19を調整している。また、複数の α -Klotho、 β -Klotho結合タンパクを見いだしており、それらの構造上の特徴を解析しており、結合の分子機構の共通性を見いだそうとしている。

2) 第3のKlotho相当分子の同定、解析

FGF21のシグナル伝達には新たなKlotho相当分子が必用であることを示唆した。そこで、第3のKlotho相当分子の同定、解析を進めてきた。ヒトのFGF21を肝臓で発現するTgマウスを作成し、新たに作成した抗ヒトFGF21抗体による免疫沈降により、結合分子の同定を進めている。

3) β -Klothoノックアウトマウスのメタボローム解析

野生型、ノックアウトマウスの肝臓、脂肪、血液、糞などのメタボローム解析を進め、コール酸グリコシドが β -Klothoノックアウトマウス尿で特異的に減少していることを見出した。最近の解析により、脂肪細胞における代謝変化を網羅的に解析することが β -Klothoの機能解析に役立つ事が示唆された事から、野生型、ノックアウトマウスのメタボローム解析を進めている。

4) β -Klotho結合タンパクの同定とその機能解析

免疫沈降により β -Klotho結合タンパク候補をリストした。ついで、免疫沈降、逆免疫沈降で結合を確認し、その機能制御における β -Klothoの役割について解析を進めてきた。分化誘導した脂肪細胞(3T3L1細胞)、野生型、 β -Klothoノックアウトマウスの初代培養

脂肪細胞、及びマウス個体を用いて、アミノ酸、インスリン、脂肪酸、胆汁酸などの投与、高脂肪餌摂取、絶食などがこれらの結合分子の機能、細胞内局在などに与える影響の解析を進め、重要なシグナル因子を特定することができた。

5) β -Klotho、FGF19/FGF15 による脂質代謝調節機構

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、ついで、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腓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機構の解明へと進めてきた。また、 β -Klothoは脂肪組織で高発現しており、脂肪組織での機能解明を含めて β -Klothoによる新しい脂質代謝制御メカニズムを解析し、脂質代謝制御に関する新規パラダイムの提唱を目指している。

6) 臨床応用に向けた研究

ヒト血清 α -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。ついで、カルシウム代謝異常患者、リン酸代謝異常患者の解析を行っており、これを継続する。また、腎不全患者、小児の解析も併せて行ってきた。

FGF23 に結合している糖鎖構造、及びそれに派生する化合物を化学合成した。これらの化合物はFGF23機能亢進の特異的の促進剤、阻害剤として利用できる可能性が高く、検討を進めている。

α -Klotho K0の変異表現型である異所性石灰化、メンケベルグ型動脈硬化、肺気腫、皮膚の萎縮などの発症を抑える化合物を見いだすことができたことから、創薬への発展を目指している。

(2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

解析を進める過程で結晶構造解析の必要性が明らかとなり、 α -Klothoの結晶構造、 α -Klotho/T178糖鎖の共結晶、 α -Klothp/FGF23の共結晶の構造解析を進めることとなった。また、原子間力顕微鏡による α -Klothp/FGF23/FGFR1複合体の可視化を進めた。更に β -Klotho、 β -Klotho/FGF19/FGFR4の結晶構造解析の準備を進めており、構造解析が重要な課題となり、当初の予定に加えることとなった。

FGF23のシグナル伝達解析の過程で、FGF23に結合している糖鎖構造の重要性が浮かび上がり、糖鎖を分離同定し、構造を解析した。また、明らかとなった糖鎖構造を合成し、その機能を解析する事で、糖鎖構造が創薬のシードとなる可能性を示した。

§ 3 研究実施体制

(1) 「鍋島」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
鍋島陽一	先端医療振興財団	センター長	H18.10～
伊村明浩	同上	主任研究員	H18.10～
前田良太	同上	研究員	H19. 4～
田中智博	同上	研究員	H19. 4～

村田宮彦	同上	研究員	H18.10～23.3
伊藤淳子	同上	技術員	H19.7～23.3
野村 礼	同上	技術員	H20.4～23.3
小林加奈子	京都大学医学研究科	大学院生	H21.4～24.3
鍋島曜子	先端医療振興財団	研究員	H22.4～
牧 幸代	同上	技術員	H22.4～23.3
中村允耶	同上	研究員	H22.4～
新谷友梨	同上	事務員	H22.4～
中川俊徳	京都大学医学研究科	研究員	H19.7～20.5
富山憲一	同上	医員	H18.10～20.3
寺尾真美	同上	技術員	H20.4～21.11
伊藤慎二	同上	助教	H19.7～23.3
高橋佑果	同上	大学院生	H20.4～22.3
岡田定規	同上	大学院生	H20.9～21.9
堀 正宏	同上	大学院生	H21.4～23.3
万木香理	先端医療振興財団	技術員	H19.4～
橋本康史	同上	研究員	H23.4～
鷺田美和	同上	技術員	H23.5～

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、代謝を制御する新規分子の同定と解析、ならびにこれらの臨床応用に関する研究

(2)「小布施」グループ

①研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
小布施力史	北海道大学生命科学院	教授	H20.10～
野澤竜介	同上	大学院生	H20.10～21.3
山口真弘	同上	同上	H20.10～H21.3
栴田浩孝	同上	同上	H21.4～H23.3
柴田幸子	同上	技術補佐員	H21.4～

②研究項目

Mass解析による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

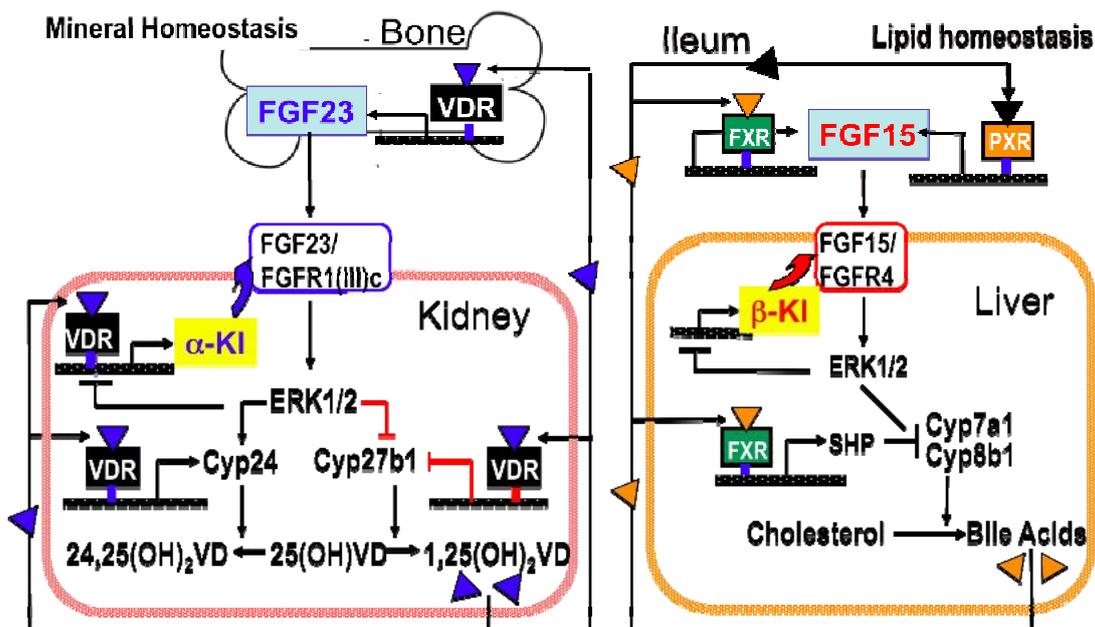
§ 4 研究実施内容及び成果

4.1 サブテーマ名1(先端医療センター鍋島グループ)

(1)研究実施内容及び成果

1. α -Klotho, β -KlothoがFGF23, FGF19を認識し、シグナルを伝える仕組みの解明

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 (Am J Physiol Renal Physiol. 2006)、 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 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2010) (図1)。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 様因子が必需であることを提唱した。よって、 α -Klotho/FGF23 のシグナル伝達機構、 β -Klotho/FGF15(19)シグナル伝達機構については解析が進み、目的は達成された。一方、細胞外 Ca²⁺の低下に伴い α -Klotho/ Na, K-ATPase 複合体が細胞表面に移動し、Na⁺の濃度勾配、膜電位の変化をもたらす (Science 2007)、腎臓における Ca²⁺の再吸収、脳脊髄液への Ca²⁺の輸送、上皮小体における PTH の分泌を促すが Science 316, 1615-1618 (2007)、Ca²⁺の低下を感知する分子の同定に至っていない。図1



2. 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 β -glucuronidase 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た。

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、腎臓に集積し、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 (投稿準備中)。

3. 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。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構築した。

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。この一連の反応において α -Klotho は FGF23 の糖鎖と結合することによって機能し、FGF23 (リガンド) と FGFR1 (受容体) を繋ぐ橋渡し役を演じる。なお、37°C 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。

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、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 (投稿準備中)。

4. Klotho 複合体の結晶構造解析

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ることを熱力学的手法で証明し、構造変換を起こした α -Klotho に naked FGF23 が効率よく、且つ、安定に結合することを証明した。この仮説を検証するためには、 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。

5. 第 3 の Klotho 相当分子の同定、解析

in vitro 解析系では β -Klotho の存在下で FGF21 のシグナルが伝達されるとのデータが得られたが、その後の解析で、新たな Klotho 相当分子が存在することが示唆されたことから、その同定、解析を進めている。アルブミン遺伝子プロモーターの制御下でヒト FGF21 を高発現するマウスを作成し、ヒト FGF21 が特異的に集積する組織を見いだした。FGF21 複合体の免疫沈降のための新たなモノクローナル抗体を分離し、結合因子の同定を進めている。

6. β -Klotho 結合蛋白の同定とその機能解析

免疫沈降により β -Klotho 結合タンパク候補をリストした。ついで、分化誘導した脂肪細胞 (3T3L1 細胞)、野生型、 β -Klotho ノックアウトマウスの初代培養脂肪細胞、及びマウス個体を用いて、アミノ酸、インスリン、脂肪酸、胆汁酸などの投与、高脂肪餌摂取、絶食などがこれらの結合分子の機能、細胞内局在などに与える影響の解析を進め、重要なシグナル因子を同定した。

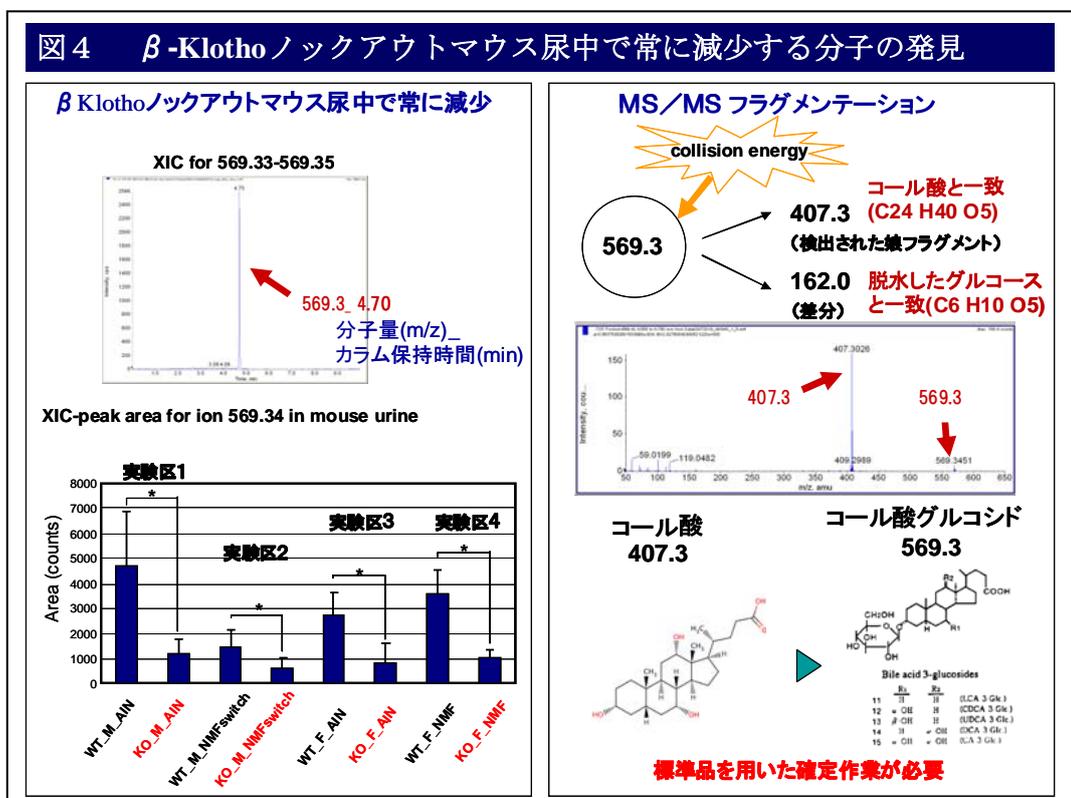
7. β -Klotho、FGF19 による脂質代謝制御

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 (Cell Metabolism 2007)。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、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

せることが示唆された。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。

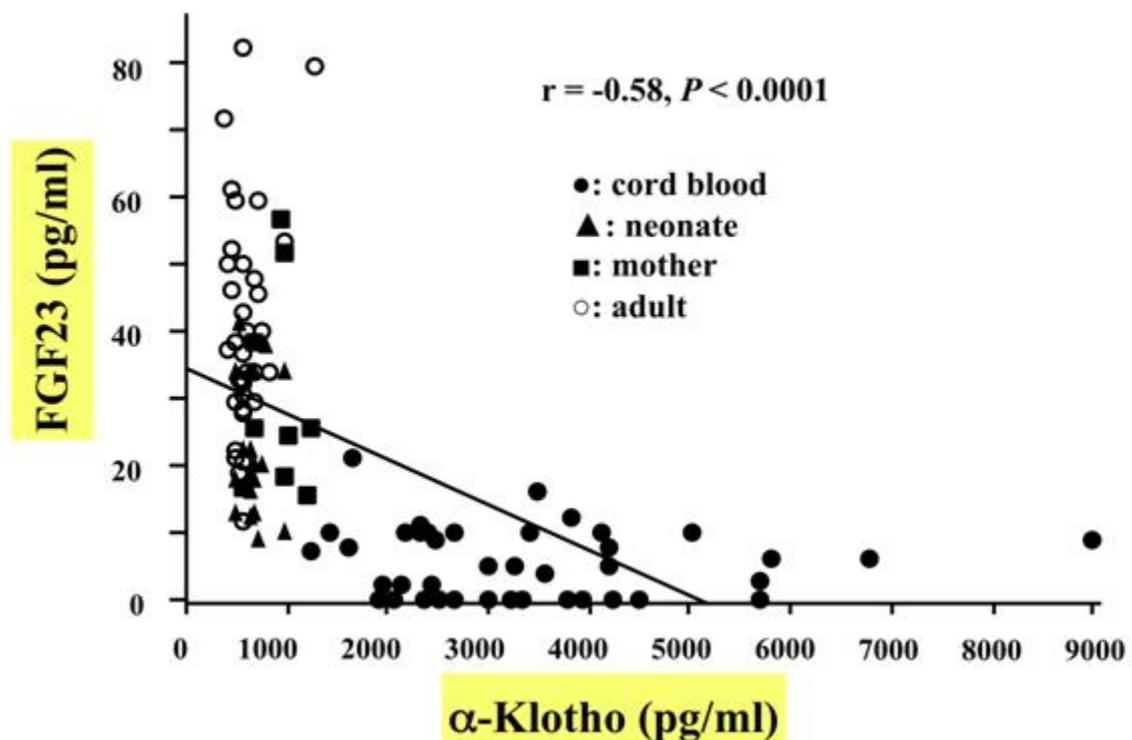
8. α -Klotho、 β -Klotho、WTの尿、血液、糞等のメタボローム解析

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(下図)。



9. 臨床応用を目指した研究

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)。ついで、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、また、腎不全患者の解析 (Clinical Nephrology, 2011) を併せて行う。(下図)



α -Klotho ノックアウトマウスでは加齢に伴う疾患、生活習慣病に類似の変異表現型が観察され (Proc Natl Acad Sci USA 2007)、その主な要因はビタミン D の恒常的機能亢進であることが明らかとなっているが、その下流で複数の経路が活性化されており、これらの活性を抑える阻害剤の投与の影響を解析し、変異表現型の発症を抑える化合物を同定した。さらに解析をすすめ、その結果をヒト加齢関連疾患の治療法の開発に役立てたい。

Klotho 遺伝子変異患者の発掘を試み、エール大学小児科グループとともに α -Klotho の血清値が 10 倍程に亢進する小児患者を発見した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008) この患者の主症状は電解質代謝異常であり、 α -Klotho 遺伝子ノックアウトマウスの変異表現系と逆の症状を示すのが特徴的である。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究の意義、期待される効果

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。

4.2 サブテーマ名2(北海道大学小布施グループ)

(1)研究実施内容及び成果

本研究では(1) β -Klotho の分子機能の解明、(2)代謝応答を制御するシグナル伝達システムの解明を目指しており、そのためには、 β -Klotho 結合蛋白、並びに細胞膜においてシグナルを受容し、伝達する分子を同定する必要があり、そのための質量分析を行う。

1. 結合蛋白の同定、網羅的解析

脂肪細胞、肝臓細胞より膜分画を集め、抗 β -Klotho 抗体により免疫沈降を行い、沈降物を SDS 電気泳動にかけ、ゲルを 2 mm 幅に切り分け、すべての質量分析を行い、結合蛋白を網羅的に同定した。本研究により β -Klotho 結合タンパクをリストアップする事に成功し、引き続き機能解析の大きな手がかりとなった。

また、最近、新たに腎臓において α -Klotho に結合する因子の網羅的解析、膵臓、脂肪細胞において β -Klotho に結合する因子の網羅的解析を行い、Klotho ファミリーの新たな機能を解析するための重要な因子が次々に見つかり、重要な手がかりが得られた。

(2)研究成果の今後期待される効果

機能未知のタンパク、シグナル伝達の分子機構解明には、結合分子の解析は必須のステップであり、質量分析による解析から極めて重要な情報が得られる。本研究では小布施グループの解析によるタンパクの同定が大きな貢献となった。

§5 成果発表等

(1)原著論文発表（国内(和文)誌 0 件、国際（欧文）誌 10 件）

1) Yokoyama K., Imura A., Ohkido I., Maruyama Y., Yamazaki Y., Hasegawa H., Urae J., Sekino H., Nabeshima Y., Hosoya T. Serum soluble alpha-Klotho in hemodialysis patients. *Clinical Nephrology* in press

2) 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 levels of soluble alpha-Klotho are markedly elevated in human umbilical cord blood. *J. Clin. Endocri. Metab.* 2011 PMID21411554

- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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) PMID 19619006
- 6) Brownstein CA, Adler F, Nelson-Williams C, Iijima J, Li P, Imura A, Nabeshima Y, Reyes-Mugica M, Carpenter TO, Lifton RP. A translocation causing increased alpha-klotho level results in hypophosphatemic rickets and hyperparathyroidism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 105(9); 3455-3460 (2008) PMID 18308935
- 7) Tanaka T., Nabeshima Y. Preview: Nampt/PBEF/visfatin: A new player in b cell physiology and in metabolic disease? **Cell Metabolism** 6, 341-343 (2007) PMID 17983577
- 8) Imura A., Tsuji Y., Murata M., Maeda R. Kubota K., Iwano A., Obuse C., Togashi K., Tominaga M., Kita N., Tomiyama K., Iijima J., Nabeshima Y., Fujioka M., Asato R., Tanaka S., Kojima K., Ito J., Nozaki K., Hashimoto N., Ito T., Nishio T., Uchiyama T., Fujimori T., Nabeshima Y. α -Klotho as a regulator of Calcium homeostasis. **Science** 316, 1615-1618 (2007) PMID 17569864
- 9) 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) PMID 17446354
- 10) Segawa H, Yamanaka S, Ohno Y, Onitsuka A, Shiozawa K, Aranami F, Furutani J, Tomoe Y, Ito M, Kuwahata M, Tatsumi S, Imura A, Nabeshima Y, Miyamoto KI. Correlation between hyperphosphatemia and type II Na/Pi cotransporter activity in klotho mice. **Am J Physiol Renal Physiol.** 292(2), F769-779 (2006) PMID 16985213

(2) その他の著作物(総説、書籍など)

- 1) Baur JA, Chen D, Chini EN, Chua K, Cohen HY, de Cabo R, Deng C, Dimmeler S, Gius D, Guarente LP, Helfand SL, Imai S, Itoh H, Kadowaki T, Koya D, Leeuwenburgh C, McBurney M, Nabeshima Y, Neri C, Oberdoerffer P, Pestell RG, Rogina B, Sadoshima J, Sartorelli V, Serrano M, Sinclair DA, Steegborn C, Tatar M, Tissenbaum HA, Tong Q, Tsubota K, Vaquero A, Verdin E. Dietary restriction: standing up for sirtuins Comment on: Science. 2010 Apr 16;328(5976):321-6. **Science.** Aug 27; 329 (5995): 1012-3 (2010) PMID 20798296
- 2) Nabeshima Y. Discovery of α -Klotho unveiled new insights into calcium and phosphate homeostasis. **Proc. Jpn. Acad. Ser. B** 85, 125-141 (2009) PMID 19282648

- 3) Nabeshima Y. The discovery of alpha-Klotho and FGF23 unveiled new insight into calcium and phosphate homeostasis. **Cell Mol Life Sci.** 65 (20): 3218-3230, (2008) PMID 18726073
- 4) Nabeshima Y., Imura H. Alpha-Klotho: a regulator that integrates calcium homeostasis **Am J. Nephrol**, 28, 455-464 (2008) PMID 18160815
- 5) Nabeshima Y. Toward a better understanding of Klotho. **Sci. Aging Knowledge Evolution.** pe11 PMID: 16672727 (2006)

鍋島陽一

新たなパラダイムによる老化とメタボリズムの理解 実験医学 (400号記念): 25, 1766-1770 (2007) 洋土社

鍋島陽一

カルシウムホメオスタシスの中心的な制御因子 α -Klotho 実験医学 25, 1793-1800 (2007)

鍋島陽一

カルシウム恒常性制御における α -Klotho の機能 医学の歩み: 222, 225-231 (2007)

鍋島陽一

カルシウム恒常性制御における α -Klotho の機能 腎と骨代謝: 20, 13-22 (2007)

鍋島陽一、伊村明浩、他

カルシウム恒常性制御因子としての α -クロトー

Japanese Scientists in *Science* 2007、20

鍋島陽一

α -Klotho はカルシウムホメオスタシスを統御する 血管医学: 9, 37-44 (2008)

鍋島陽一

α -Klotho、FGF23 の発見がもたらしたカルシウム・リン制御の新たなコンセプト *Clinical Calcium*: 18, 923-934 (2008)

鍋島陽一

α -Klotho の分子機能と老化についての一考察

医学の歩み 227 (8)、574-579 (2008)

鍋島陽一

α -Klotho とカルシウム代謝

腎と骨代謝 22 (2)、105-112 (2009)

鍋島陽一

α -Klotho 変異マウスの Ca^{2+} 代謝異常、動脈の石灰化

血管医学 11 (2) 117-123 (2010)

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

①口頭発表 (国内会議 15 件、国際会議 11 件)

Nabeshima Y

α -Klotho that integrates calcium homeostasis International Endocrinology Conference June 4 2007 Toronto

Nabeshima Y.

The discovery of α -Klotho and FGF23 unveiled new insight into calcium and phosphate homeostasis. Kyoto University Symposium at **Shang hai Oct. 10, 2008** Fudan unixeristy Shang-hai

Nabeshima Y.

Discovery of α -Klotho unveiled new insights into calcium homeostasis
13th International Congress of Endocrinology Nov.10, 2008 Rio de Janeiro

Nabeshima Y.

Klothos and FGF19 subfamily: Newly discovered metabolic regulators
Gordon Research Conference [Fibroblast Growth Factors in Development & Disease]
March 14-19, 2010 Ventura, CA, USA

Nabeshima Y.

Klothos and FGF19 subfamily: Newly discovered metabolic regulators
Invited Lecture at Washington University Faculty of Medicine March 22, 2010 St. Luis
Maeda R., Tanaka T. Imura A. Nabeshima Y.

Gurucuronized steroids inhibited alpha-Klotho-dependent FGF23 signaling. Therapeutic implications for FGF23-caused rickets.

14th International Congress of Endocrinology (ICE 2010) March 29, 2010 Kyoto

Nabeshima Y.

α -Klotho and FGF23: Newly discovered mineral regulators
The satellite symposium on bone of the 14th international congress of endocrinology
March 31, 2010 Osaka

Nabeshima Y.

Klotho and FGF19 subfamily; newly discovered metabolic regulators. Asian asing core for longevity research and education 2010 Jeju Conference Aug. 22 to 24, 2010 Jeju island Republic of Korea

Nabeshima Y.

α -Klotho regulates FGF23 activity via binding to *O*-linked glucuronide moiety
Invited Lecture at South Western Medical Center Nov. 11, 2010 Dallas

Nabeshima Y.

α -Klotho regulates FGF23 activity via binding to *O*-linked glucuronide moiety
Thai GCOE international symposium Dec. 16, 2010 Mahidol University

Nabeshima Y.

alpha-Klotho: a regulator that integrates calcium homeostasis

学術振興会先端研究拠点事業 「骨・軟骨疾患の先端的疾患分子医科学」国際シンポジウム・ワークショップ 10月28日2007 東京

鍋島陽一

α -Klotho の分子機能とカルシウム代謝制御機構

第41回 日本痛風・核酸代謝学会総会 特別講演 2月14日 2008 福井

鍋島陽一

健康な体を維持する仕組み

日本分子生物学会 春期シンポジウム 5月25日 2008 札幌

鍋島陽一

Klotho family の発見が切り開いた新たな生体応答システム

埼玉医大ゲノム医学センター国際シンポジウム 10月25日 2008 埼玉

鍋島陽一

Klotho family の発見が切り開いた新たな生体応答システム

日本免疫学会関連分野セミナー 12月3日 2008 京都

鍋島陽一

Klotho family の発見が切り開いた新たな生体応答システム

分子生物学会シンポジウム 生命維持に 必須な代謝調節機構 12月9-12日 2008

神戸

鍋島陽一

動物個体の生存戦略と Klotho family

日本病理学会 特別講演 2009年 5月1-3日 京都

鍋島陽一

Klotho family の機能と動物個体の生存戦略

日本分子生物学会 春のシンポジウム 5月11日 2009 宮崎

鍋島陽一

Klotho family の機能と動物個体の生存戦略

実験動物学会シンポジウム「モデルマウスを用いた老化への分子遺伝学的アプローチ」

5月16日 2009 大宮

鍋島陽一

動物個体の生存戦略と Klotho family

高血圧関連疾患モデル学会 2009年 9月4日 東京

鍋島陽一

動物個体の生存戦略と Klotho family

日本生化学会シンポジウム 2009年 10月24日 神戸

鍋島陽一

α -Klotho 変異マウスの Ca^{2+} 代謝異常、動脈の石灰化

血管医学 11 (2) 117-123 (2010)

鍋島陽一

α -Klotho の分子機能——分子間認識、シグナル伝達制御における糖鎖の意義——

岡崎バイオセンター創立10周年記念シンポジウム 2011年2月10日～12日 岡崎

鍋島陽一

α -Klotho の分子機能——分子間認識、シグナル伝達制御における糖鎖の意義——

第4回 In vivo 実験医学シンポジウム 2011年2月23日 東京

鍋島陽一

Klotho family による生体恒常性の制御

日本内分泌学会 教育講演 2011年4月23日 神戸

鍋島陽一

α -Klotho の分子機能——分子間認識、シグナル伝達制御における糖鎖の意義——

分子生物学会春のシンポジウム 2011年5月26日 金沢

(4)知財出願

①国内出願 (0件)

②海外出願 (0件)

③その他の知的財産権
なし

(5)受賞・報道等

①受賞

2010年11月 紫綬褒章の叙勲を受ける。

2009年 9月 岡本国際賞 (成人血管病研究振興財団)

2009年 4月 文部科学大臣表彰科学技術賞「研究部門」(文部科学省)

2007年11月 武田医学賞 (武田科学振興財団)

②マスコミ(新聞・TV等)報道

③その他

§6 研究期間中の主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

鍋島陽一(京都大学)

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2008年11月7日	「代謝」研究領域第1回公開シンポジウム	ココヨホール	251名	CREST研究課題の成果について口頭およびポスターにて発表
2009年10月16日	「代謝」研究領域第2回公開シンポジウム	日本科学未来館・みらいCANホール	155名	CREST研究課題の成果について口頭およびポスターにて発表
2011年11月1日	「代謝」研究領域第4回公開シンポジウム	東京大学・弥生講堂	139名	CREST研究課題の成果について口頭およびポスターにて発表

§7 結び

得られた成果

1) ヒト、マウスの解析結果を総合して、「 α -KlothoはNa⁺, K⁺-ATPase(細胞内タイプ)、FGF23/FGFR(細胞膜上タイプ)と結合しており、その機能制御を介してカルシウム・リン

恒常性を維持するための多段階の制御機構を統御する因子と機能している」との結論した。
2) ノックアウトマウスの解析により、 β -Klotho は肝臓においてコレステロールから胆汁酸を合成する Cyp7a1 の発現を負に制御する因子として機能しており、ノックアウトマウスでは多量の胆汁酸が合成され、多量の胆汁酸が糞に排出され、一方、不足するコレステロールを補う為に HMGCoA-reductase の発現亢進がおこることが確認された。

3) α -Klotho と FGF23 の相互作用をモデルに作用機構を解析した。その結果、(1) α -Klotho はグリコシダーゼファミリーの一員であり、FGF23 の糖鎖が α -Klotho に結合する事により、low affinity form から high affinity form に conformational changes をおこすこと、(2) 糖鎖は FGF23 の複合体形成を安定化させることによって FGF23 の腎臓への集積、生理濃度でのシグナル伝達を実現していることを明らかにした。

4) α -Klotho、 β -Klotho はそれぞれ複数の分子と結合しており、これらの分子とも統一的な機構によって結合していることを示唆する結果をえた。

5) 原子力間顕微鏡により α -Klotho、FGF23、FGFR1 から成る 3 者複合体の構造を可視化し、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す結果を得た。

6) α -Klotho ノックアウトマウス、 β -Klotho ノックアウトマウス、野生型マウスの血液、尿に含まれるメタボローム解析を行い、ノックアウトマウスで特異的に増加、あるいは減少しているメタボライトの同定を試みた。該当するピークが得られたが、データベースに登録されていないケースの分子実体の決定が課題となっている。網羅的メタボローム解析はサンプル群間の差異をみいだすことはできるが、更に解析を進めるには、化合物データベースの飛躍的な発展を必要とすることが示された。

7) α -Klotho の血中濃度を測定するエライザキットを開発し、 α -Klotho 血中濃度は、新生児、幼児で高く加齢に伴って減少すること、FGF23 の血中濃度と逆相関することが明らかとなった。

8) α -Klotho 変異表現型は腎不全の合併症と酷似しており、化合物の投与により発症が抑えられる事を確認し、治療法開発の大きな手がかりが得られた。

今後の発展

1) α -Klotho の結晶構造、 α -Klotho/T178 糖鎖の共結晶、 α -Klotho/FGF23 の共結晶等の構造解析へと研究が進展している。

2) 多数の α -Klotho、 β -Klotho 結合分子が同定され、その機能解析が進行しており、研究は大きな広がりを見せている。

3) 腎不全、糖尿病では病気の進行に伴い、重篤な合併症が起り、死因、予後の不良の要因となっており、これらの合併症の発症を抑える研究が進展している。

自己評価

α -Klotho、 β -Klotho の機能解析、その医学応用に付いては、評価すべき結果が得られた。一方、メタボローム解析については、網羅的解析の域をこえることができなかった。また、研究が最終年度に大きく進展したことから、論文発表が間に合わなかったが、早急に取りまとめる予定である。なお、低分子化合物による治療法の開発は製薬企業との共同開発に進むべく、交渉中であり、大きく発展する事を期待している。

定年退職と研究室の引っ越し

2010年3月に京都大学を定年退職した。京都大学で2011年3月まで研究を続け、2011年4月より神戸の先端医療振興財団先端医療センターに実験室を移した。幸い、京大時代の研究ファシリティを維持し、メンバーも神戸に移動し、また、神戸ポートアイランドの機能の活用も可能であり、支障なく研究を継続できる状況にあるので、更なる発展を目指してがんばりたいと思っている。神戸では、クロトーチームとアルツハイマーチームの2チーム体制で研究を行っている。(新しい研究室での集合写真を添える)

