

クロトファミリーの分子機能解明を基盤とした代謝の臓器 関連に関する研究

Study of the metabolic regulation based on the
elucidation of molecular function of Klotho family

鍋島 陽一 (NABESHIMA YO-ICHI)

公益財団法人先端医療振興財団先端医療センター・センター長



研究の概要

α -Klotho、 β -Klotho、FGF19 subfamily の発見は代謝制御を統合的に担う新たなシステムであり、その解明は老化の解明、加齢関連疾患の病態解析、治療法の開発に資すると期待された。本研究では、関連する分子間の相互作用の解析、結晶構造解析を進めることにより新たに見いだされた制御システムの解明を進めている。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：クロト、FGF19 subfamily、恒常性、生活習慣病、代謝制御

1. 研究開始当初の背景

α -Klotho、 β -Klotho、FGF19 subfamily の発見は代謝制御を統合的に担う新たなシステムを浮き彫りにした。この新規システムは電解質代謝、脂質代謝、エネルギー代謝、アミノ酸代謝の制御に及んでおり、まさに動物個体の生存と機能維持を統合的に担うものであり、その解明は老化の解明、加齢関連疾患の病態解析、治療法の開発に資すると期待される。

2. 研究の目的

本研究課題では α -Klotho、 β -Klotho、FGF19 subfamily 等、関連分子間の特異的認識機構を解明し、これらの分子の分子機能、生理機能解明の分子基盤とする。本目的達成のため、以下の4課題を推進してきたが、研究の進展により第5の課題を加えた。

課題1： α -Klotho・ Na^+ 、 K^+ ATPase 複合体形成の分子機構の解明。

課題2： α -Klotho、 β -Klotho が FGF23、FGF19 を特異的に認識し、組織特異的にシグナルを伝達する機構の解明。

課題3：FGF21 の組織特異的シグナル伝達を制御する機構野解明、複合体形成の分子機構、代謝制御に於ける役割の解析。

課題4： β -Klotho の脂質代謝、コレステロール代謝制御における機能の解明。

課題5： α -Klotho 変異マウスでは顕著なカル

パインの活性化が起こっており、その阻害剤投与により変異表現型の改善を試みる。

3. 研究の方法

課題1： α -Klotho と Na^+ 、 K^+ ATPase が特異的に複合体を形成する機構を解析する。

課題2： α -Klotho、 β -Klotho との複合体形成に寄与する FGF23、FGF19 も糖鎖構造を決定する。 α -Klotho、 β -Klotho の立体構造を解析し、FGF23、FGF19 の糖鎖配列を分別して認識し、結合する機構を解析する。

課題3：活性型 FGF21 のシグナル伝達機構を詳細に解析し、関連する分子を同定する。FGF21 の翻訳後修飾を解析し、複合体形成における役割を解析し、FGF21 のシグナル伝達機構、代謝制御における役割を解析する。

課題4： β -Klotho 結合因子を同定し、これらの複合体の機能に影響を与える分子を調べる。また、結合因子のノックアウトマウス、高発現マウスなどの解析を進め、脂質代謝、コレステロール代謝、アミノ酸代謝における β -Klotho 複合体の役割を解明する。

課題5： α -Klotho 変異マウスは多彩な加齢関連症状を示す。また、蛋白分解が顕著に活性化されており、その阻害剤を投与し、その効果を解析する。

4. これまでの成果

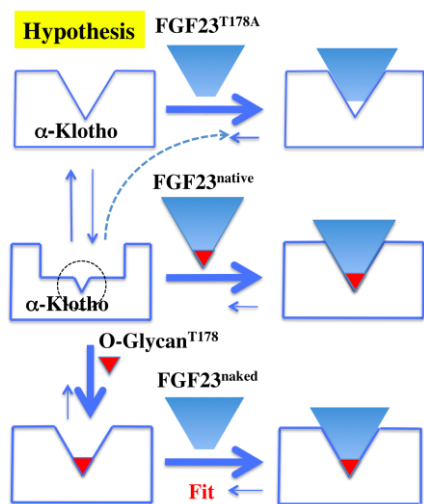
(1) α -Klotho はグルクロン酸認識レクチン

α -Klotho はグルクロン酸認識モチーフをもつ。また、同定した全ての α -Klotho 結合タンパク質が HNK-1 抗体 (N 型糖鎖末端の $\text{GlcA-O-Gal-O-GalNAc-O-}$ 配列を認識す

る)と共通に反応することを発見した。更に、 α -Klotho のグルクロン酸認識モチーフが結合相手のグルクロン酸修飾を受けた糖鎖を認識、選択的に結合すること、また、FGF23 の特殊な O 型糖鎖も α -Klotho のグルクロン酸認識モチーフに直接結合することを発見、「 α -Klotho は β -glycosidase から進化したグルクロン酸を認識する新規のレクチンである」と結論した。

(2) FGF23 の O 型糖鎖の構造と機能

FGF23 の 178 番目のスレオニンに結合する糖鎖 (O-Glycan^{T178}) が FGF23 のシグナル伝達制御を担っていることを突き止めた。O-Glycan^{T17} の新規糖鎖構造を決定した。また、O-Glycan^{T178} は FGF23 の腎臓への集積、FGF23 と α -Klotho の結合の促、生理的濃度でのシグナル伝達を担っていることを確認した。その機構として O-Glycan^{T178} 糖鎖が α -Klotho に結合し、 α -Klotho を FGF23 と結合しやすい状態へとシフトさせることにより FGF23 と α -Klotho の結合を促進、安定化させることを発見し、「タンパク間相互作用における糖鎖の新たな機能」を提唱した。



(3) FGF23 シグナル伝達制御モデルの提案

FGF23 シグナル伝達の分子機構を示すモデルを構築した。FGF23 は α -Klotho に効率よくトラップされ、腎臓に集積し、FGFR1 と共に FGF23/ α -Klotho/FGFR1 複合体を形成する。2 個の α -Klotho/FGF23 複合体の 4 つのドメインがリングを作り、2 分子の FGFR1 を取り巻くことによって FGFR1 を活性化し、シグナルを伝える。

(4) β -Klotho 結合分子の同定と機能解明

β -Klotho は肝臓において FGFR4、FGF15 と複合体を形成し、胆汁酸合成を抑える機構が明らかとなった。一方、 α -Klotho と同様、 β -Klotho も Na^+ , K^+ -ATPase と複合体を形成、アミノ酸代謝の新たな制御機構の研究へと進展している。 β -Klotho の発見と機能解析の進展により α -Klotho システムとの作用メカニ

ムの共通性が浮かび上がった。

(5) FGF21 の組織特異的シグナル伝達機構

ヒト FGF21 を肝臓で発現する Tg マウスを作成し、大腸菌で合成した FGF21 より活性が高いこと、翻訳後修飾が異なっていることを示唆するデータが得られた。

(6) ヒト老化類似疾患の治療法開発研究

顕著な蛋白分解の活性化が α -Klotho 変異マウスの多彩な老化類似症状をもたらす要因であることを見だし、阻害剤を α -Klotho 変異マウスに投与し、多様な症状が顕著に改善することを確認した。また血清 FGF23 濃度が石灰化の指標となることを示した。

5. 今後の計画

課題 1: α -Klotho とグルクロン酸修飾を受けた Na^+ , K^+ -ATPase- β -subunit の結晶化を試み、構造解析へと発展させる。 β -Klotho/ Na^+ , K^+ -ATPase 複合体形成を担う糖鎖修飾構造を決定し、 α -Klotho、 β -Klotho の分子認識の特徴、共通性を明らかにする。**課題 2:** α -Klotho、 α -Klotho と FGF23 の複合体の結晶構造解析を進め、FGF23 の O 型糖鎖が α -Klotho に結合することによって起こる構造変化を解明する。同様に β -Klotho と FGF19 の結晶構造を解明、 α -Klotho、 β -Klotho が FGF23、FGF19 を仕分けて認識する機構を解明する。

課題 3: FGF21 の組織特異的なシグナル伝達に機能する第 3 の Klotho 様因子を同定し、複合体形成の分子機構、エネルギー代謝の臓器相関、ネットワーク制御制御に於ける役割を解析する。

課題 4: β -Klotho と多数の結合分子からなる複合体の機能を解析、摂取脂肪の低下に対する応答機構、アミノ酸代謝の新たな制御機構を解明する。

課題 5: 経口投与が可能で安全性の高い阻害剤を入手し、創薬に結び付ける。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)
1) Tomiyama K., et al Relevant use of Klotho in FGF19 subfamily signaling system *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107; 1666-1671 (2010)

2) Yamazaki Y. et al 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)

3) Asai O. et al Decreased renal alpha-Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion. *Kidney Int.* 81(6):539-547 (2012)

日本学士院賞(2013) 日本内分泌学会マイスター賞(2013) 紫綬褒章 (2010)

ホームページ等

URL: <http://www.ibri-kobe.org>