

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12340

研究課題名(和文) 老化制御と食事因子：糖鎖修飾ダイエット

研究課題名(英文) Dietary factors and aging control: Glycosylation modified diets

研究代表者

宮本 賢一 (MIYAMOTO, Kenichi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教授

研究者番号：70174208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：カロリー制限などのような食事修飾は、寿命延長効果を有する。Klotho欠損(KL)マウスは、短命で、老化が促進したモデルマウスである。リン制限食は、KLマウスの寿命を延長させ、その表現型を回復させる。本研究では、リン制限食による糖鎖修飾機能について、Npt2cを例として解析した。リン制限食により、Npt2cとKlothoは、誘導され、Npt2cの糖鎖修飾パターンが、変化した。KlothoとNpt2cの欠損マウスを掛け合わせたKLNpt2cマウスでは、明らかに、klothoマウスの老化兆候が改善した。よって、リン制限は、糖鎖修飾を誘導する食事因子と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Dietary modifications such as calorie restrictions have a lifespan extension effect. Klotho deficient (KL) mice are short-lived, aged-promoted model mice. The inorganic phosphate (Pi)-restricted diet prolongs the life span of KL mice and restores its phenotype. In this study, we investigated whether Pi-restricted diet causes the modification of the N-glycosylation of Npt2c. By Pi-restricted diet, Npt2c and Klotho were induced, and the N-glycosylation pattern of Npt2c was changed. KLNpt2c (Klotho/Npt2c DKO) mice showed the rescued KL phenotypes. In conclusion, Pi restriction was considered to be a diet inducing N-glycan modification.

研究分野：生活科学・食生活学

キーワード：リン 寿命 腎臓 食事 klotho

1. 研究開始当初の背景

食生活の乱れは、栄養代謝異常に起因する心血管障害、糖尿病、慢性腎臓病などの生活習慣病の発症に関与している。最新のニュートローム解析技術により、食事と各種疾患との関係において膨大な研究が蓄積された。その結果、食事による老化や生活習慣病の原因として、糖鎖修飾酵素機能が重要な位置を占める可能性が明らかにされた。糖鎖は、核酸及び蛋白質とならぶ、第3の生命鎖とも呼ばれ、自然界に存在する蛋白質全種類の、約半数以上は糖鎖修飾を受けた糖蛋白質として存在している。Klotho 遺伝子は、ヒトの老化に良く似た症状を呈する突然変異マウス (klotho マウス) の原因遺伝子として同定され、klotho を変異させたモデル動物では、短命、成長障害、高リン血症、高カルシウム血症などの老化症状を示すが、リン制限食やビタミンD制限食により表現型が回復する。さらに、klotho を過剰発現させた動物は寿命が延長し、低リン血症を呈する事が明らかにされている。我々は、糖鎖遺伝子発現解析技術を用いて、リン制限食による腎尿細管におけるリン輸送分子の糖鎖修飾解析した結果、II型ナトリウム依存性リン輸送タンパク質 NaPi-IIc (Npt2c) の糖鎖修飾がリン制限摂取で影響される事が明らかになった。

2. 研究の目的

リン制限食には生体における糖鎖修飾機序が存在する事を明らかにする為に、腎臓に注目した。血中リン濃度の維持には、腎臓近位尿細管に発現する2型Na依存性リン酸トランスポーター (NaPi-II) が重要な役割を担う。NaPi-II サブファミリーである Npt2c は近年、家族性低リン血症性くる病 (HHRH) の責任遺伝子であることが報告され、ヒトにおける重要性が明らかになっている。膜型 Klotho は生体内において FGF23、FGF レセプターと結合し、Npt2c の発現調節を行っている。一方で最近、膜型 Klotho の細胞外領域が切断され血液、尿中へ分泌され、分泌型 Klotho として独自の機能を持つことが報告されている。分泌型 Klotho はN型糖鎖を介してカルシウムチャネル TRPV5 の機能を調節

しているが、リン代謝における役割は明らかではない。そこで本研究では低リン食による Npt2c の糖鎖修飾の分子機能に関して、糖鎖修飾酵素 Klotho との関係調べた。

3. 研究の方法

動物解析

マウスは恒温の飼育室で明暗サイクルの条件下 (8:00-20:00) プラスチックケージ内で飼育した。KLKO マウス ; C57BL/6J -Klotho (KL) ヘテロマウスは日本クレア株式会社 (CLEA Japan, Inc. Tokyo, Japan) で購入した。ヘテロマウスを交配し、Klotho^{+/+} (WT) マウス、Klotho^{-/-} (KLKO) マウスを得た。

KL2cDKO マウス作製 ; C57BL/6J 系統の Npt2cKO マウスは、Npt2c 遺伝子の exon 3 にある転写開始点を含めた exon 2-5 の領域を neomycin 耐性遺伝子に置き換えることにより作製した。C57BL/6J -Klotho (KL) ヘテロマウスと Npt2cKO ヘテロマウスを交配 (一次交配) し、Klotho/Npt2c ダブルヘテロマウス作製後これらを交配 (二次交配) することにより、Klotho^{-/-}/Npt2c^{-/-} (KL2cDKO) マウスを得た。

食餌組成 : 食餌中リン含量による調節を検討するため、アメリカ国立栄養研究所げっ歯類用試料 AIG-93G 精製試料をオリエンタル酵母より購入し、ミネラル混合から CaCO₃ および KH₂PO₄ を除去したものをを用いて、コントロール (CP) 食 (Pi:0.6%、Ca:0.6%)、低リン (LP) 食 (Pi:0.02%、Ca:0.6%) を調節した。水は微量元素としてカルシウム、リンを含む水道水を避け、蒸留水を自由摂取させた。また、タンパク源としてエッグホワイト (キューピー) を用いた。WT 及び kl/kl マウスは7週齢から食餌を CP 食から LP 食に換えて飼育した。約 20 週齢で解剖し臓器を採取し、腎については BBMV を精製した。

蛋白解析

調製した BBMV にサンプルバッファー (125 mM Tris-HCl pH 6.8、4% SDS、20%グリセロール、0.2%プロモフェノールブルー、βメルカプトエタノール) を等量混合し、95°C で3分間加熱した後、直ちに氷冷した。BBMV は

10% SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、Hybond-P (Amersham pharmacia biotech) に電氣的に転写した。このメンブレンは、5%スキムミルク/1×TBST (Tris-base、NaCl pH 7.61)/Tween20 を用いて、室温で1時間ブロッキングした後、type IIa 及び IIc Na/Pi トランスポーター抗体 (type IIa [8000:1]、type IIc [1000:1]) と 4°C で一晩インキュベートした。さらに、このメンブレンを HRP 標識した抗体 (peroxidase-conjugated affini pure goat anti-rabbit IgG) と室温で1時間インキュベートした後、ECL+plus Kit (Amersham) を用い、1 分間蛍光発色させ、フィルムに感光させ検出した。

アフリカツメガエル卵母細胞を用いた輸送機能検討

アフリカツメガエル(雌)は、埼玉実験動物(株)より購入した。アフリカツメガエルは、0.1% 3-AMINOBENZOIC ACID ETHYL ESTER (SIGMA) に 10~15 分浸すことによって麻醉し、卵母細胞の塊をカエルの下腹部から外科的に摘出した。摘出した卵母細胞は 2 ng/ml コラゲナーゼ A (BOEHRINGER MANNHEIM) を含む Ca^{2+} free の OR 溶液 (8.25 mM NaCl、2 mM KCl、1mM $MgCl_2$ 、10 mM Hepes/Tris pH 8.5) で 30~40 分処理し、コラゲナーゼが残らないように Ca^{2+} free の OR 溶液で十分に洗浄した。さらに Barth's solution (88 mM NaCl、1 mM KCl、0.82 mM $MgCl_2$ 、0.41 mM $CaCl_2$ 、0.33 mM $Ca(NO_3)_2$ 、2.4 mM $NaHCO_3$ 、10 mM Hepes) で洗浄し、defolliculation solution (110 mM NaCl、1 mM EDTA、10 mM Hepes) 中で、follicular layer を取り除いて Barth's solution 中で保存した。卵母細胞に、0.5 μ g/ μ l の濃度の cRNA 及び poly (A)⁺RNA を 50 nl (1 個あたり 25 ng の cRNA) 手動インジェクター (NARISHIGE) で注入し、50 ng/ml の gentamicin (SIGUMA) を含む Barth's solution 中で、18、2 日間保存した。

4. 研究成果

KLK0 マウスの表現型

KLK0 マウスは、既に報告されているように

WT マウスと比較して血中 Ca 濃度および血中 PTH 濃度に変化は見られないが、血中 Pi、血中 FGF23、および血中 $1,25(OH)_2D_3$ 濃度はともに有意な上昇を認めた。また 24 時間尿中排泄量は、Ca、Pi とともに WT マウス、KLK0 マウス間で差は見られなかった。

5 週齢および 8 週齢の WT マウス、KLK0 マウス腎臓における石灰化を確認した。5 週齢においては、WT マウス、KLK0 マウスともに石灰化は確認されなかったが、8 週齢ではこれまでの報告通り、KLK0 マウスにのみ顕著な石灰化が確認された。

KLK0 マウスにおける腎リン輸送活性およびリン酸トランスポーター発現

8 週齢 WT マウス、KLK0 マウスの腎臓 BBMV を用いて Na 存在下における Pi 輸送活性およびリン酸トランスポーター発現の検討を行った。を検討した。KLK0 マウス 小腸リン酸輸送活性は、WT マウスと比較し増加傾向が認められた。また KLK0 マウス腎における Npt2a および Npt2c mRNA 発現は、WT マウスと比較して有意な変化は認められなかった。糖鎖解析による Npt2a および Npt2c 糖鎖修飾を行ったところ、WT マウスと比較して、KLK0 マウスにおいて Npt2a 糖鎖修飾に差は認められなかったが、Npt2c 糖鎖修飾は差が認められた。この Npt2a および Npt2c の発現を確認するため免疫蛍光染色を行ったところ、Western Blotting 解析と同様、腎臓 Npt2a の発現に変化は見られず、Npt2c のみの膜局在の増加が確認できた。

KL2cDK0 マウスの解析

KL2cDK0 マウスは、KLK0 マウスと比較して寿命の延長が見られ、身体も大きく、毛並みにもつやがでた。また、WT マウス、KLK0 マウス、KL2aDK0 マウス、Npt2aK0 マウス、KL2cDK0 マウス、および Npt2cK0 マウスの体重変化を 20 週齢まで追跡した。これまでの報告通り、WT マウスと比較して、Npt2cK0 マウスでは変化がなく、Npt2aK0 マウスはわずかに体重減少が認められた。KLK0 マウスは特に離乳後からの体重減少が確認された。既に報告されているように、KL2aDK0 マウスは

Npt2aKO マウスと KLKO マウスの中間型の発育が見られた。一方、KL2cDKO マウスにおいても、KL2aDKO マウスとほぼ同様の体重変化がみられた。

8週齢の Npt2cKO マウスは WT マウスと比較して、血中 Ca、およびリン濃度に変化は認められないが、血中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の軽度上昇、および FGF23 濃度の軽度低下が認められる。KL2aDKO マウスは既に報告されているように、KLKO マウスと比較して有意に血中 Ca 濃度の高値、血中リン濃度の低下、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度の上昇が認められ、FGF23 濃度は高値を維持していた。KL2cDKO マウスは、KLKO マウスと比較して血中 Ca、Pi、および FGF23 濃度に大きな違いは認められなかったが、わずかなのであるが、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度に減少傾向が認められた。

KL2cDKO マウス腎臓における石灰化、肺組織の病理所見

WT マウス、および Npt2cKO マウスは、腎結石は認められない。KLKO マウス(8週齢)は、腎臓皮質において広範囲に腎結石が認められる。一方、KL2cDKO マウスでは、KLKO マウスと比較して石灰化症状の大幅な緩和が確認された。さらに肺組織の HE 染色を観察した。これまでに報告されている通り、KLKO マウスでは肺胞毛細血管内への顕著な血液貯留、毛細血管内水分の間質への漏出といった肺水腫様症状が見られたが、KL2cDKO マウスでは KLKO マウスに認められた肺水腫症状が改善し、WT マウスおよび Npt2cKO マウスと同様の肺所見であった。

KLKO マウスにおける Npt2c の糖鎖修飾

Npt2c は、成長期において発現が顕著増加し、成熟するにつれて減少することから成長期に重要なリントランスポーターであると考えられている。腎臓における Npt2a タンパク質の糖鎖修飾パターンは、WT マウスと比較し KLKO マウスでは顕著な変化は認められなかったが、Npt2c タンパク質の糖鎖修飾パターンには、変化が観察された。KL2cDKO マウスは、KLKO マウスと比較して Npt2a の糖鎖修飾パターンに違いは確認されなかった。一方、

KL2aDKO マウスにおける Npt2c の糖鎖修飾パターンは、低リン食摂取時と同様に、変化が観察された。

細胞レベルの解析

袋ネズミ腎近位尿細管由来 OK 細胞、およびアフリカツメガエル卵母細胞に、Npt2c を過剰発現させ検討を行った。Npt2c は N 型糖鎖修飾蛋白質であり、変異体の実験から糖鎖が局在並びにリン輸送活性に重要であることが明らかとなった。次に、分泌型 Klotho の Npt2c に対する作用について検討したところ、両実験系とも分泌型 Klotho 処理によりリン輸送活性が有意に低下した。分泌型 Klotho の機能の一つとして、シアリダーゼ活性が報告されているが、シアリダーゼ処理により Npt2c リン輸送活性が有意に上昇したのに対し、分泌型 Klotho はシアリダーゼ阻害剤による作用を受けなかったことから、Npt2c に対する分泌型 Klotho の作用はシアリダーゼ活性非依存的であることが示された。また Npt2c 糖鎖付加不全変異体では分泌型 Klotho の作用が消失したことから、分泌型 Klotho は糖鎖を介して Npt2c の機能を調節していることが示唆された。これらの結果より Klotho は FGF23 シグナルを介した経路と、管腔側からの分泌型 Klotho による経路の 2 つの異なる経路を介して Npt2c の糖鎖修飾調節を行っていることが考えられた。

以上、分泌型 Klotho による Npt2c の糖鎖修飾と、その影響を明らかにした。また、KL2cDKO マウスにおいて KLKO マウス表現型の改善が確認された。Klotho は、生体内において、リン制限食で誘導され、腎臓での糖鎖修飾に影響する可能性が示唆された。リン制限食は、KL マウスの寿命を延長させ、その表現型を回復させる。本研究では、リン制限食による糖鎖修飾機能について、Npt2c を例として解析した。リン制限食により、Npt2c と Klotho は、誘導され、Npt2c の糖鎖修飾パターンが、変化した。Klotho と Npt2c の欠損マウスを掛け合わせた KLNpt2c マウスでは、明らかに、klotho マウスの老化兆候が改善した。よって、リン制限は、糖鎖修飾を誘導する食事因子と考えられた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Kaneko I, Tatsumi S, Segawa H, Miyamoto KI. Control of phosphate balance by the kidney and intestine. Clin Exp Nephrol. 2017;Mar21(Suppl 1):21-26.

doi:10.1007/s10157-016-1359-4. 査読有.

Hydo T, Hirakawa N, Hayashi M, Mand Than KM, tuyen DG, Hu LW, Naramura T, Miyamoto K, Yamashita AC. Present status of renal replacement therapy at 2015 in Asian countries (Myanmar, Vietnam, Thailand, China, and Japan).

Renal Replace Ther. 2017;3:11

doi.10.1186/s411100-016-0082-7. 査読有.

Tatsumi S, Miyamoto K.

Regulation of inorganic phosphate ion homeostasis: crosstalk kidney and other organs. Nihon Yakurigaku Zasshi. 2016;147(2):84-88.

doi:10.1254/fpj.147.84. 査読無.

Fukagawa M, Inaba M, Yokoyama K, Shigematsu T, Ando R, Miyamoto KI. An introduction to CKD-MBD research: restart for the future. Clin Exp Nephrol. 2016;Mar21(Suppl 1):1-3.

doi:10.1007/s10157-016-1372-7. 査読有.

Segawa H, Hanazaki A, Miyamoto K.

Intracellular and extracellular functions of phosphorus compound in the body. Clin Calcium. 2016;Feb26(2):187-191.

doi:10.1007/s10157-016-1372-7. 査読無.

Tatsumi S, Miyagawa A, Kaneko I, Shiozaki Y, Segawa H, Miyamoto K.

Regulation of renal phosphate handling: inter-organ communication in health and disease. J Bone Miner Metab. 2016 Jan;34(1):1-10.

doi:10.1007/s00774-015-0705-z. 査読有.

Watanabe E, Yamagata Y, Kogirima M, Miyamoto K, Kayashita J. Development of a simple and objective evaluation for thickened liquid using funnels.

J Texture Studies 2016;1-7.

doi:10.1111/jtxs.12235. 査読有.

Taketani Y, Masuda M, Yamanaka-Okumura H, Tatsumi S, Segawa H, Miyamoto K, Takeda E, Yamamoto H. Niacin and chronic kidney disease. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2015;61 Suppl:S173-175.

doi:10.3177/jnsv.61.S173. 査読有.

Segawa H, Shiozaki Y, Kaneko I, Miyamoto K. The role of sodium-dependent phosphate transporter in phosphate homeostasis.

J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).

2015;61Suppl:S119-121.

doi:10.3177/jnsv.61.S119. 査読有.

Tatsumi S, Nagamoto K, Ogata M, Miyamoto K. Bone and Nutrition. Sclerostin and bone metabolism. Clin Calcium. 2015;25(7):1043-1047.

doi: 10.1007/s10157-016-1372-7. 査読無.

Kaneko I, Segawa H, Tatsumi S, Miyamoto K. Genetic diseases of renal phosphate handling. Nihon Jinzo Gakkai Shi. 2015;57(4):758-765.

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26126333 査読無.

Shiozaki Y, Segawa H, Ohnishi S, Ohi A, Ito M, Kaneko I, Kido S, Tatsumi S, Miyamoto K. Relationship between sodium-dependent phosphate transporter (NaPi-IIc) function and cellular vacuole formation in opossum kidney cells.

J Med Invest. Vol62(3-4) Aug2015;209-218.

doi:10.2152/jmi.62.209. 査読有.

〔学会発表〕(計 6 件)

Sawako Tatsumi, Atsumi Miyagawa, Osamu Fujii, Mao Ogata, Ichiro Kaneko, Hiroko Segawa, Keni-Ichi Miyamoto.

Hepatectomy-Induced Hypophosphatemia: Mechanisms Underlying Downregulation of Phosphate Transport in the Small Intestine. American Society of Nephrology. Kidney Week 2016. シカゴ (米国) 2016/11/17.

Kayo Ikuta, Hiroko Segawa, Shihoko Yuki, Ichiro Kaneko, Ai Hanazaki, Toru Fujii, Aoi Kushi, Sawako Tatsumi,

Ken-Ichi Miyamoto.

Salivary Pi Handling May Be under the Control of Gastrointestinal Pi Sensing. American Society of Nephrology Kidney Week 2016. シカゴ (米国) 2016/11/16.

Ken-Ichi Miyamoto. Regulation of Renal Phosphate Handling: Inter-organ Communication.

American Society of Nephrology Kidney Week 2016. シカゴ (米国) 2016/11/16.

Ken-ichi Miyamoto and Yutaka Taketani. Phosphorus content in daily foods and drinks: Does it matter? XVIII International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease (ICRNM2016). 沖縄コハナショナルセンター (沖縄県宜野湾市) 2016/4/19.

Ichiro Kaneko, Rimpi K Saini, G.Kerr Whitfield, Mikiko Ito, Hiroko Segawa, Sawako Tatsumi, Ken-ichi Miyamoto, Mark R. Haussler, and Peter W. Jurutka. A Nurr1-dependent phosphaturic hormone gene that is transcriptionally regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D. XVIII International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease (ICRNM2016). 沖縄コハナショナルセンター (沖縄県宜野湾市) 2016/4/19.

Ai Hanazaki, Hiroko Segawa, Kayo Ikuta, Toru Fujii, Ichiro Kaneko, Shihoko Yuki, Shiori Nishiguchi, Keiji Notsu, Yuji Shiozaki, Sawako Tatsumi, Ken-ichi Miyamoto. Genetic Deletion of NaPi-2c Rescues Phenotype of klotho Knockout Mice without Improving Severe Hyperphosphatemia. American Society of Nephrology Kidney week. シカゴ (米国). 2015/11/8.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 賢一 (MIYAMOTO, Kenichi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号: 70174208

(2) 研究分担者

瀬川 博子 (SEGAWA, Hiroko)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師
研究者番号: 70325257

辰巳 佐和子 (TATSUMI, Sawako)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号: 80420545