

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：84503

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：21390058

研究課題名（和文） クロトー分子が解明する糖鎖構造の解析

研究課題名（英文） Analyses of the glycan structure of which Klotho recognizes

研究代表者

伊村 明浩（IMURA AKIHIKO）

公益財団法人先端医療振興財団 先端医療センター 主任研究員

研究者番号：60362513

研究成果の概要（和文）： ベータクロトーはおもに肝臓の肝細胞で発現している、グリコシダーゼ様ドメインを二つ持つ I 型の膜タンパク質である。アルファクロトーとともにクロトーフファミリーに属する。

胆汁酸合成の制御をとおした脂質の取り込み量の調整など、広くエネルギー代謝に関わる内分泌性タンパク質（ホルモン）のひとつとして、線維芽細胞増殖因子（FGF）-19 が同定された。この FGF-19 は小腸（より胃から遠い回腸末端部に発現が多い）の上皮細胞に発現しており、門脈中を循環して肝細胞にシグナルを受け渡す。そのシグナルを伝えるために、ベータクロトーを必要とする。

ベータクロトータンパク質はアルファクロトータンパク質同様に、糖鎖を認識するレクチン構造をもつ（糖結合タンパク質のことレクチンとよぶ）。そのため、その認識する糖鎖構造が FGF-19 にもあるものと考え、これまで研究を進めてきた。本研究課題において、特殊糖鎖特異的抗体を用いることで、ベータクロトーが特異的に認識する糖鎖構造を見出すことに成功した。

この発見は、クロトーフファミリータンパク質がレクチンとしてどのように、FGFシグナルを伝えるのかの理解につながった。それだけでなく、アルファクロトーはナトリウムカリウムポンプ複合体との結合にも、同様の糖結合機構を使っていることが分かった。つまり、ひとつのタンパク質が、どのようにして複数の分子（FGFファミリーとナトリウムカリウムポンプ）と相互作用するのかについて、合理的に理解することができた。

本課題での発見は今後、ナトリウムカリウムポンプ複合体のような生理分子がどのように細胞膜表面まで調節的に運ばれるか、という生理学上の未解決な問題を解く糸口となる。つまり、糖転移酵素による糖鎖修飾の制御が、生理分子の輸送を調節していることがわかった。この成果をもとに、糖鎖の生物学的な意義を解明する研究が広く行われることになると期待される。

研究成果の概要（英文）： Beta-Klotho, a type-I single-spanning membrane protein, has two tandem glycosidase-like domains and is expressed mainly in hepatocyte. The gene, beta-klotho, and alpha-Klotho belong to the Klotho family.

FGF19 was identified as a lipid mediator; which controls bile acids synthesis to regulate lipid intake. The FGF19 protein is expressed in ileum to input signal in liver. Expression of the beta-Klotho is necessary for the signal.

Like alpha-Klotho, beta-Klotho recognizes a monosaccharide as well. Therefore, we deduced that the monosaccharide is attached to FGF19 protein. Using an antibody for unique glycan, we have identified the specific glycan of which beta-Klotho recognizes.

Our study revealed how these Klotho lectins transduces the FGF signals. Furthermore, we have shown that alpha-Klotho binds to NaK-ATPase through the same recognition system. Meanwhile, it has been understood how one protein can bind to distinct binding partners, FGF family and NaK-ATPase complex.

Our understandings will lead to solve unsolved questions that how physiological proteins, such as NaK-ATPase complex, are recruited to the surface membrane. That is, it would be understood that regulation of glycosylation by several glycosyl transferases regulates transports of the physiological molecules. It should be expected that more wide study to reveal biological significance of glycan would spread.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
年度			
総計	7,900,000	2,370,000	10,270,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：受容体・細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

老化遺伝子として発見されたアルファークロトローは、その老化様症状を与える原因としていくつかの説が提出された。1) ナトリウムカリウムポンプと複合体を形成して、細胞膜表面へと輸送する。こうして形成されたあらたなナトリウムカリウム勾配が、カルシウムイオンやリン酸イオンの輸送に用いら

れる。さらに、このときに形成されるナトリウム勾配は、副甲状腺ホルモンの分泌にも必須である（伊村ら2006年サイエンス）。

2) 線維芽細胞増殖因子23の共受容体として、そのシグナルを伝える。このシグナルが伝えられないと、ビタミンDが過剰に合成され、体内のカルシウムイオンとリン酸イオンの濃度が病的に上昇する。その結果、骨粗鬆症などの老化様症状があらわれる。3) アル

ファークロトローがカルシウムチャネル（トリップチャネル）の糖鎖修飾を切断し、そのチャネルの細胞膜表面量を増やす。アルファークロトローの発現が無いことで、このカルシウムチャネルの活性が抑制され、カルシウムイオンの再吸収が抑制される。その結果、骨粗鬆症が引き起こされる。4) アルファークロトローがインシュリンシグナルを抑制する。分泌されたアルファークロトローがインスリン受容体の活性化を抑制することで、エネルギー代謝を落とし長生きする。5) アルファークロトローがウィントシグナルを阻害する。幹細胞の増殖を抑制するウィントシグナルが、アルファークロトローノックアウトマウスでは亢進しているため、幹細胞が減少するため老化様症状をしめす。

上記のように、アルファークロトローノックアウトマウスが老化様症状を示すことを説明する分子機構は、まことに混沌としていた。

## 2. 研究の目的

本研究課題の研究目的として、線維芽細胞増殖因子（FGF）-19のホルモンとして十分に高い活性をあたえる、翻訳後修飾（おもにO型糖鎖修飾）を明らかにすることを掲げた。換言すれば、その糖鎖修飾とはベータクロトータンパク質が認識する糖鎖構造であり、それを明らかにすることでもある。

生体内に比較的少なく存在する、ある特殊な構造をもった糖鎖に対する特異的抗体を用いた研究から、ベータクロトータンパク質が認識する糖鎖構造をほぼ特定するまで至った。

さらに、期待以上の成果として、ナトリウムカリウムポンプのベータサブユニットとアルファークロトローの結合にも、同様に

N型糖鎖修飾が重要な役割を果たしていることを明らかにすることができた。このきわめてまれなN型糖鎖修飾は、腎臓においてナトリウムカリウムポンプのベータサブユニットに特異的になされており、この糖鎖修飾を目印としてアルファークロトローが糖鎖を認識していることがわかった。

しかしながら、これらの糖鎖の詳細な構造（糖の結合の向きや修飾基の位置）は未だ確定できていない。そのため、今後はFGF-19を培養細胞に大量合成し、さらに大量に精製をすることで、核磁気共鳴法（NMR法）による糖鎖構造の確定をおこなわなければならない。このための、培養細胞をもちいた大量合成、および大量精製系を立ち上げた。

さらに、ニワトリを抗体産生動物として用いて、マウスのFGF-19にたいする特異的抗体を作製した。最新のニワトリモノクローナル抗体作成技術を用いて、そのモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞を樹立することができた。このモノクローナル抗体をもちいて、マウスにおけるFGF-19の発現部位の同定を、詳細に確定することができた。さらに、この結果、マウスの小腸の上皮細胞から直接、生体内のFGF-19を精製することができるようになり、本研究課題の研究目的である、糖鎖構造の確定へと大きくすすめるようになった。

## 3. 研究の方法

線維芽細胞増殖因子（FGF）-19の修飾糖鎖構造を核磁気共鳴法（NMR法）で確定する。

本研究課題を通じて、マウスのFGF-19を特異的に認識する抗体を作製することに成功した（「現在までの達成度」の項参

照)。この抗体を用いて、マウスの小腸上皮細胞から、生体内に存在するFGF-19を大量に精製することをこころみる。とくに、このニワトリモノクローナル抗体での組織染色から、マウスの小腸の回腸末端部において、FGF-19のタンパク質が高発現している上皮細胞を見出すことができた。そのため、このマウスの回腸末端部の小腸上皮をスタート実験材料にして、ここからマウスの『エンドジェナス』なFGF-19の精製をはじめ。

また、特殊糖鎖特異抗体を用いた解析を通じて、ベータクロトーが認識する糖鎖構造が分かってきたことから、汎用される培養細胞にその糖鎖修飾酵素群を発現させて、FGF-19に糖鎖を付加することをこころみる。つまり、培養細胞において、生理活性の高いFGF-19を人工的に造り出す方法を開発する。そのさいに、清水先生（広島大学）の開発された「ほ乳類複製開始点」「マトリックス結合領域」遺伝子配列をFGF-19遺伝子を発現する培養細胞へと組み込む。こうすることで、従来の約100倍の発現をもつ安定発現株を得ることを目指す（株式会社トランスジェニックへの委託）。

こうして得た精製FGF-19タンパク質から、ヒドラジン分解にて糖鎖を切り出してPAラベル化する。低速液体クロマトグラフィー（平成23年度の本研究課題の予算にて購入済み）をもちいて、PAラベルを指標にこの糖鎖を分離精製する。

精製した糖鎖を核磁気共鳴法(NMR法)で測定することで、その原子レベルでの構造を明らかにする。この構造を確定する上に必要な、複数の標準糖鎖を有機合成する。これらの測定と合成はいずれも、株式会社ナード研究所と株式会社東京化成に実績が

あり委託する。

#### 4. 研究成果

線維芽細胞増殖因子(FGF)-19の修飾糖鎖構造を推定することができた。

本研究課題を通じて、マウスのFGF-19を特異的に認識する抗体を作製することに成功した。この抗体を用いて、マウスの小腸上皮細胞から、生体内に存在するFGF-19を大量に精製できるようになった。とくに、このニワトリモノクローナル抗体での組織染色から、マウスの小腸の回腸末端部において、FGF-19のタンパク質が高発現している上皮細胞を見出すことができた。そのため、このマウスの回腸末端部の小腸上皮をスタート実験材料にして、ここからマウスの『エンドジェナス』なFGF-19の精製ができるようになった。これらはいずれも世界に先駆けて成功したことであり、今後のクロトーに依存したFGF研究を主導するものとなる。

#### 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9件)

1) Serum soluble alpha-Klotho in hemodialysis patients.

Yokoyama K, Imura A, Ohkido I, Maruyama Y, Yamazaki Y, Hasegawa H, Urae J, Sekino H, Nabeshima YI, Hosoya T. Clin Nephrol. 2012 May;77(5):347-51.

2) Decreased renal  $\alpha$ -Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion.

Asai O, Nakatani K, Tanaka T, Sakan H, Imura A, Yoshimoto S, Samejima K,

Yamaguchi Y, Matsui M, Akai Y, Konishi N, Iwano M, Nabeshima Y, Saito Y. *Kidney Int.* 2012 Mar;81(6):539-47.

3) Circulating levels of soluble alpha-Klotho are markedly elevated in human umbilical cord blood. Ohata Y, Arahori H, Namba N, Kitaoka T, Hirai H, Wada K, Nakayama M, Michigami T, Imura A, Nabeshima Y, Yamazaki Y, Ozono K. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Jun;96(6):E943-7.

4) Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. 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. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jul 30;398(3):513-8.

5) Relevant use of Klotho in FGF19 subfamily signaling system in vivo. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jan 26;107(4):1666-71.

6) Persistent alpha-Klotho ( $\alpha$ -K1) expression in the parathyroid glands of patients with secondary hyperparathyroidism. Ohkido I, Yokoyama K, Imura A, Utsunomiya Y, Hosoya T, Nabeshima Y. *Nephrol Dial Transplant.* 2010 Mar;25(3):1007-8

7) alpha-Klothoの構造と機能 伊村明浩, 腎と骨代謝, vol. 25, 2012, 33-40 (2012)

8) 鍋島陽一、伊村明浩、前田良太、Klotho、メタボリック FGF による代謝の統合制御、

実験医学、30巻、2011、252-259

9) 前田良太、伊村明浩、鍋島陽一、Klothoファミリーによる内分泌性 FGF のシグナル制御、細胞工学、31巻、2011、434-439

[学会発表] (計 9 件)

- ① Imura Akihiro、Nabeshima Yo-ichi、Different profiles of acute PTH secretion: A comparison between alpha-Klotho and FGF23-knockout mice、The endocrine society's 93<sup>rd</sup> annual meeting and EXPO、2011、Jun. 4<sup>th</sup>、Boston、USA
- ② Maeda Ryota、Imura Akihiro、Nabeshima Yo-ichi、A glucuronized steroid is useful for cure of FGF23- and alpha-Klotho dependent rickets、The endocrine society's 93<sup>rd</sup> annual meeting and EXPO、2011、Jun. 4<sup>th</sup>、Boston、USA
- ③ Maeda Ryota、Imura Akihiro、Nagata Kazuhiro、Henrissat Bernard、Nabeshima Yo-ichi、Klotho acts as a novel lectin that binds terminal sulfated glucuronyl moieties、The 31<sup>st</sup> Naito Conference、2011、Sep. 14<sup>th</sup>、Sapporo
- ④ 前田良太、伊村明浩、鍋島陽一、ProteOn XRP システムを用いたクロトーレクチンの糖タンパク質、糖鎖、糖脂質との結合解析への応用、第 84 回日本生化学会大会バイオインダストリーセミナー、招待講演、2011、9月22日、京都
- ⑤ 前田良太、伊村明浩、鍋島陽一、グルクロン酸認識レクチンとしてのクロトー、第 84 回日本生化学会大会、口演発表、2011、9月24日、京都
- ⑥ 前田良太、伊村明浩、鍋島陽一、グルクロン酸認識レクチンとしてのクロトー、第 84 回日本生化学会大会、ポスター発表、2011、9月24日、京都
- ⑦ 前田良太、伊村明浩、クロトーは修飾糖鎖を認識することで FGF シグナルを伝える、第二回公開シンポジウム「修飾シグナル病」学術領域の新展開、ポスター発表、2012、1月28日、東
- ⑧ 伊村明浩、遠位尿細管、副甲状腺、脈絡膜に発現する体液カルシウムセンサーの解明、平成 21 年度 特定領域研究「セルセンサー」夏の班会議 2009 年 6 月 29 日-30 日 沖縄コンベンションセンター
- ⑨ 伊村明浩、クロトー分子と共役するカルシウム代謝分子群のモーダルシフト平成 22 年度 特定領域研究「セルセンサー」冬の班会議 2010 年 12 月 24 日-26 日 国際交流会館
- ⑩ 伊村明浩、 $\alpha$ クロトーが認識する糖鎖の

構造決定とシグナル様式の解明、平成23年 新学術領域「シグナル修飾病」第1回 領域推進会議 2011年7月1日-2日 東京大学医科学研究所

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称： $\alpha$ -Klotho.FGF23 複合体形成阻害化合物

発明者：前田良太、伊村明浩、鍋島陽一

権利者：前田良太、伊村明浩、鍋島陽一

種類：特許

番号：特願 2011-136719

出願年月日：2011年06月19日

国内外の別：国内

○取得状況(計◇件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊村明浩 (Akihiro Imura)

公益財団法人先端医療振興財団・先端医療センター・主任研究員

研究者番号：60362513

### (2) 研究分担者

該当無し ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

前田良太 (Maeda Ryota)

公益財団法人先端医療振興財団・先端医療センター・研究員

研究者番号：50432399