

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：84503
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23770166
 研究課題名（和文） ベータクロトリーの認識する糖鎖構造にもとづく活性型 FGF19 の同定を目指した研究
 研究課題名（英文） Identifying the active form of FGF19 based on the fact that beta-Klotho recognizes a distinct sugar motif.
 研究代表者
 前田 良太（RYOTA MAEDA）
 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

研究成果の概要（和文）：内分泌型線維芽細胞装飾因子（FGF23、FGF19 および FGF21）は適切な翻訳後修飾、とくに、ある特定の糖鎖修飾を受けることでその高い生理活性が得られることが知られている。FGF23 に高い生理活性を与える修飾糖鎖の詳細な解析を基に、FGF19、FGF21 に高い生理活性を与える修飾糖鎖の同定を行なった。どちらもその高い生理活性を得るには、糖鎖修飾の中でもグルクロン酸修飾がもっとも重要な影響を与えることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have proposed that specific carbohydrate modifications play an important role in physiological activities of the endocrine fibroblast growth factors, including FGF-23, FGF-19, and FGF-21. Based on our previous study that a sugar modification increases activities of FGF-23, we tried to identify any modifications that enhance activities of other endocrine fibroblast growth factors, FGF-19 and FGF-21. Consequently, we show that a distinct terminal glucuronic acid sugar modification is sufficient for proper activity of these growth factors.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-------------|-------------|-------------|
| 2011 年度 | 2, 200, 000 | 660, 000 | 2, 860, 000 |
| 2012 年度 | 1, 400, 000 | 420, 000 | 1, 820, 000 |
| 総計 | 3, 600, 000 | 1, 080, 000 | 4, 680, 000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物物理学・機能生物化学

キーワード：細胞・組織、シグナル伝達、生理活性、蛋白質、糖鎖

1. 研究開始当初の背景

(1) 内分泌型線維芽細胞増殖因子（FGF）は臓器間にシグナルを伝えることが知られていた。これまでに主に 3 つの因子が知られており、それらは①骨で分泌され腎臓にシグナルを伝える FGF23、②小腸で分泌され肝臓にシグナルを伝える FGF19、③肝臓から分泌される FGF21 である。

(2) これらの増殖因子が、標的臓器にシグナル

を伝えるには、それぞれのシグナルを受容する線維芽細胞増殖因子受容体の他に、シグナルを介在するタンパク質の発現が必要であることが分かった。それぞれのシグナル分子に対する介在タンパク質として、① FGF23 シグナルを受容するための、腎臓に発現しているアルファクロトリー、② FGF19 シグナルを受容するための、肝臓に発現しているベータクロトリー、がすでに発見されていた。また、③ FGF21 シグナルは標的臓器がまだ分かっておらず、ベータクロトリーの関与が

考えられているが、いまだそれが介在していることは確立されていない。

(3)腎臓に発現しているアルファクロトーとFGF23は直接結合する。一方で、アルファクロトーは糖結合タンパク質であることが知られていた。これらのことを考え合わせると、FGF23の糖鎖修飾が、アルファクロトーとの結合に何らかの影響を及ぼすのではないかと推論された。

(4)糖鎖修飾を受けないFGF23は、糖鎖修飾を受けているFGF23に比べて、アルファクロトーへの結合力が低下していた。そこで、この修飾糖鎖の構造を解析した結果、末端にグルクロン酸を持つことが分かった。

(5)アルファクロトーはこの末端にグルクロン酸を持つ糖鎖に直接結合することができる。このことから、アルファクロトーはグルクロン酸糖鎖を認識する「グルクロン酸レクチン」であるということが出来る。

(6)FGF19は肝臓にシグナルを伝える際に、介在タンパク質としてベータクロトーを必要とする。ベータクロトーとアルファクロトーのアミノ酸相同性から、ベータクロトーも糖認識タンパク質であることが予測された。

(7)FGF19の修飾糖鎖、およびベータクロトーの認識する糖鎖の構造を同定することで、FGF19はいったいどのような分子機構で、高い生理活性を得ているのかを理解する研究を試みた。

2. 研究の目的

(1)生理活性の高いFGF19を同定する。

① 糖鎖修飾がFGF23に高い生理活性を与えることを手掛かりに、FGF19が糖鎖修飾を受ける残基を特定する。

② FGF19の修飾糖鎖の構造を原子レベルで決定する。

③ 培養細胞に糖鎖修飾酵素を発現させることで、生理活性の高いFGF19を再構成する。

(2)ベータクロトーの認識する糖鎖構造を決定する。

① アルファクロトーがグルクロン酸を認識することを手掛かりに、その類似糖を中心にベータクロトーが認識する糖(単糖)を

もとめる。

② ベータクロトータンパク質の活性中心を構成するアミノ酸残基の配置が、どのように特定の糖を認識するのかを、原子レベルで理解する。

3. 研究の方法

(1)FGF19点変異体ライブラリーを作製する。

① 糖鎖修飾を受けるアミノ酸残基を特定するために、その修飾を受ける可能性があるアミノ酸残基に点変異を入れ、その一連の変異体FGF19を作製する。

② これらの変異体FGF19ライブラリーを、培養細胞に発現させる。ウェスタンブロットで解析することで、どのアミノ酸残基に糖鎖が付加されるかを解析する。

③ 糖転移酵素をFGF19とともに発現させることで、どの糖転移酵素がFGF19に糖鎖を付加させうるのかを見出す。

(2)抗FGF19抗体を作製する。

① マウスの抗FGF19抗体をニワトリに免疫することで、抗マウスFGF19ニワトリ抗体を作る。大腸菌にマウスのFGF19を発現させ、組み換えタンパク質を精製し、免疫源とする。事前の条件検討では、大腸菌に合成させて精製したマウスのFGF19をマウスに免疫しても、抗体価が上がらず、免疫できなかったことが分かっていた。

② 抗マウスFGF19抗体のモノクローナル抗体を樹立する。ニワトリのハイブリドーマ作製法が確立していることから、この技術を用いてニワトリのモノクローナル抗体産生細胞を樹立する。

③ エライザ検出系を作製することで、マウス血液中、および組織中のFGF19の濃度を測定する。上記で樹立したモノクローナル抗体と、免疫したマウスの血清中に含まれるポリクローナル抗体を用いることで、マウスのFGF19を定量できるサンドイッチエライザ系を開発する。

(3)天然型のFGF19を精製する。

① 樹立したモノクローナル抗体を用いて、マウスの小腸組織から内在性のFGF19を精製する。精製したモノクローナル抗

体のアフィニティーカラムを作製することで、精製の効率を高めることができる。

- ② エサの摂取状況、小腸の解剖学的位置（空腸と回腸による違いや胃からの距離）、および日内変動により、FGF 19の発現量は大きく異なる。そのため、サンドイッチエライザ系を用いることで、どの条件で最も多くのFGF 19が生体から得られるかを見積もる。

(4) FGF 19の糖鎖構造を決定する。

- ① 生体から精製したFGF 19をトリプシン消化しペプチド断片にする。逆相カラムにより分離したペプチドを、質量分析計を用いて解析する。得られたスペクトルの中から糖鎖修飾を受けたペプチドを見出す。

- ② 糖鎖修飾を受けたペプチド断片をMS-MS解析することで、その糖鎖の分子量と開裂パターンからその構造を推定する。

- ③ 推定された糖鎖を有機合成する。FGF 23に付加されている糖鎖を有機合成することに成功している。この経験にもとづいて、FGF 19に付加されている、質量分析計で推定された糖鎖構造を実際に有機合成することで大量に得る。

- ④ 合成した糖鎖のNMRスペクトルと、FGF 19から分離した糖鎖のそれを比較することで、その構造を決定する。

(5) 活性の高い糖鎖修飾を持つFGF 19の産生を培養細胞で再現する。

- ① 決定されたFGF 19の糖鎖構造を合成する糖転移酵素の候補をリストする。この糖転移酵素を組み合わせることで培養細胞発現させることで、FGF 19に人工的に修飾糖鎖を付加する。

- ② O型糖鎖付加修飾の第一段階の糖修飾酵素である、Nアセチルガラクトサミン糖転移酵素複数種類のうち、どの酵素がFGF 19にNアセチルガラクトサミンを付加できるかを見出す。

- ③ 上記に次ぐ第2段階の反応酵素と予想される、グルクロン酸転移酵素3種類以上のうち、どの酵素がFGF 19にグルクロン酸を付加するかを見つける。

- ④ グルクロン酸糖鎖修飾の最終段階と予想される、硫酸基転移酵素およびグルクロン酸異性化酵素のうち、どの酵素の組み合わせ

せがFGF 19の糖鎖を修飾し、FGF 19に高い生理活性を与えるのかを決定する。

- ⑤ これらFGF 19の糖鎖修飾を促す酵素を適切な量比で培養細胞に発現させることで、生理活性の高いFGF 19を産生、分泌できる細胞を得る。

- ⑥ この細胞のスクリーニングは、産生されたFGF 19のベータクロトローへの結合能を評価することで行なう。定量的な結合は、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance)法で解析する。

(6) ベータクロトローの立体構造を決める

- ① ベータクロトローの構造モデルをアルファクロトローの構造を基に予測する。アルファクロトローの立体構造モデルが解かれている。この構造モデルデータに基づいて、ベータクロトローのとりうる立体構造をコンピューター計算により予測する。

- ② ベータクロトロータンパク質のエックス線結晶構造解析を行なうことで、その原子レベルでの立体構造を明らかにする。ベータクロトローを大量に発現する培養細胞を樹立する。精製したベータクロトロータンパク質、数ミリグラムを用いて、結晶化条件をもとめる。結晶化条件の最適化を経て、大型放射光施設スプリング8にて、ベータクロトロータンパク質結晶のエックス線回折データを取得する。得られた回折データから、ベータクロトローの立体構造を解析する。

- ③ とくにベータクロトローの活性中心の構造を基に、認識する糖鎖構造を自由エネルギー計算により判定する。ベータクロトローの活性中心の構造データから、この構造がどのような糖鎖を認識しうるのかを推定する。各糖の転移酵素、結合タンパク質、分解酵素の構造をもとに、最も強く結合する糖鎖構造を予測し、実際の実験結果と比較し考察する。

4. 研究成果

(1) FGF 19の糖鎖修飾を受けるアミノ酸残基を特定した。

- ① マウスFGF 19にはN型糖鎖修飾を受けうるアスパラギン残基は存在しないため、O型糖鎖修飾を受けるセリン、スレオニン残基をアラニン残基に次々と変異を入れた点変異体ライブラリーを作製した。

- ② マウスFGF 19のC末端ドメインにあ

るセリン残基の少なくとも一つに糖鎖修飾を受けうることが分かった。この残基は調べた限りの種によって保存されていたため、この残基の糖鎖修飾は種によって保存されているとの考察を得た。

(2) FGF 19 の抗体を樹立した

① 大腸菌で合成したマウス FGF 19 を精製して、ニワトリに免疫した。免疫した 2 羽とも血清中の抗体価が上がり、血清を採取することで、抗マウス FGF 19 ニワトリポリクローナル抗体が得られた。さらに、この抗体を精製することに成功した。

② この免疫をした 2 羽のニワトリからリンパ組織を採取し、抗体産生ハイブリドーマ細胞を作製した。このハイブリドーマ細胞ライブラリーを、精製したマウス FGF 19 タンパク質にする結合活性を指標に、表面プラズモン共鳴法によってスクリーニングした。その結果、結合定数が低く、解離速度の遅い、FGF 19 タンパク質の立体構造を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を 2 種類樹立することができた。この 2 種類の細胞の培養上清それぞれ約 1 リットル分から、モノクローナル抗体約 2 ミリグラムを精製することに成功した。

③ この 2 種類の精製された抗マウス FGF 19 ポリクローナル抗体と、精製された抗マウス FGF 19 モノクローナル抗体を得た。これらの抗体はいずれも、同様の染色像を与え、生体内のマウス FGF 19 を認識できていることを確認した。

(3) FGF 19 サンドイッチエライザ系を確立した

① 上記のポリクローナル抗体 2 種類と、モノクローナル抗体 2 種類を組み合わせることで、マウス FGF 19 に対するエライザ検出系の開発を進めた。

② このエライザ系は目下、IBI 社の協力によって開発が進んでいる。

(4) FGF 19 高発現するマウスを得た

① 生体内のマウス FGF 19 タンパク質を得る目的で、内在性の FGF 19 を多く発現している状態のマウスを得た。

② FGF 19 の発現は食事による影響を受けること、日内変動することを確認できた。

③ 小腸組織の中でも、とくに大腸に近い回腸部分に多く発現していることを突き止めた。

④ この小腸組織を作製した抗体で免疫染色することで、FGF 19 の発現する組織と、細胞内局在までを特定することに成功した。

⑤ さらに、既に系統を樹立していた、ベータクロトノーックアウトマウスの小腸組織では、FGF 19 の発現量が野生型のマウスと比べ大きく亢進していることを発見した。このマウスを用いることで、より多くの内因性の FGF 19 を生体内から得ることが可能となった。

(5) 糖転移酵素の発現ベクターライブラリーを作製した

① 糖転移酵素群のうち基本的な酵素群の、ほ乳動物の培養細胞に対する発現ベクターライブラリーを構築した。

② これらのうち、Nアセチルガラクトサミン転移酵素の 1 つ、グルクロン酸転移酵素の 3 つ、硫酸基転移酵素の 1 つを培養細胞に発現させ、実際に基質となるタンパク質に、思いどおりの糖鎖を付加させることができることを確認した。

③ これらの酵素を発現させることで産生された FGF 19 と、ベータクロトノーとの結合を定量する測定系を確立した。プロテオシステムを導入したことで、ハイスループットの比較定量が行なえるようになった。

(6) ベータクロトノーの認識する糖鎖構造を推定することができた

① ベータクロトノーの発現している臓器であるマウスの肝臓、脾臓、脂肪組織から、抗ベータクロトノー抗体を用いて免疫沈降し、その結合物を網羅的に解析した。

② その結果、特徴的な糖鎖修飾を持つことが知られているタンパク質群が、ベータクロトノーと共沈してくることが分かった。

③ これらの特徴は、アルファクロトノーの認識する糖鎖構造にきわめて似ているものの、部分的に異なる可能性を予見させるものであった。少なくともグルクロン酸修飾という点では共通しているが、その後の硫酸化修飾や、異性化修飾が異なるものと予想された。

④ 事実として、ベータクロトローノックアウトマウスの肝臓でのFGF受容体の糖鎖修飾が変化していることを発見した。この受容体の糖鎖修飾を、マウスの肝臓で検出する実験系を開発できた。

(7)ベータクロトローの発現細胞を新規な方法で構築することで、数ミリグラムの発現細胞株を得ることができた

① すでに、アルファクロトローをヒト培養細胞に高発現する細胞株を樹立することに成功している。この方法と同様な方法を用いることで、十分な生理活性を持ったベータクロトロータンパク質を高発現するヒト培養細胞株を樹立することができた。

② この培養細胞を用いることで、培養上清約1リットル分から、数ミリグラムの精製ベータクロトロータンパク質を得ることができた。

(8)ベータクロトロータンパク質の結晶を得ることができた

① この精製ベータクロトロータンパク質を用いて、結晶化のスクリーニングを行なうことができた。少なくとも複数の結晶化条件で、ベータクロトロータンパク質が結晶化することを見出した。

② とくに、ベータクロトロータンパク質の修飾糖鎖をエンドグリコシダーゼと、ノイラミニダーゼで除去することで、結晶の最適化を行うことに成功した。

③ アルファクロトロータンパク質結晶のエクスクス線回折データを大型放射光施設スプリング8にて取得した。

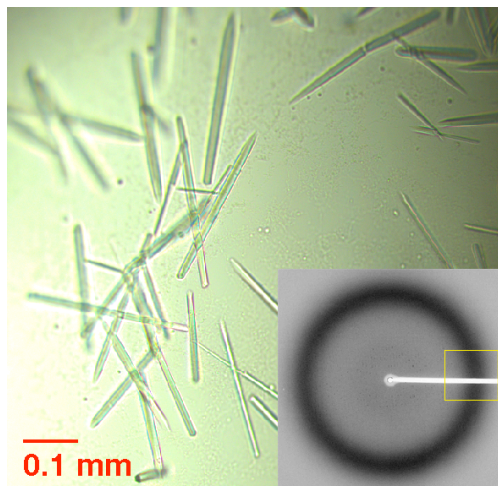


図1 アルファクロトロー結晶

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3件)

① Maeda Ryota, Imura Akihiro, Nabeshima Yo-ichi, Complex regulation and diverse functions of alpha-Klotho, *Contrib Nephrol.* 査読有、180巻、2013年、25頁-46頁 (DOI: 10.1159/000346777)

② 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年、252頁-259頁

③ 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、*査読有*、*細胞工学*、31巻、2011年、434頁-439頁

[学会発表] (計12件)

① 前田良太、クロトローの、グルクロン酸糖鎖およびFGF23との複合体としての構造解析、文部科学省・科学研究費補助金・新学術領域研究「構造細胞生物学」第4回全体会議、ポスター発表、2013年、6月21日、山梨

② 橋本康史、前田良太、糖鎖認識タンパク質ベータクロトローの構造解析、文部科学省・科学研究費補助金・新学術領域研究「構造細胞生物学」第4回全体会議、ポスター発表、2013年、6月20日、山梨

③ Maeda Ryota, Imura Akihiro, Nabeshima Yo-ichi, Gulucuronyl carbohydrate modification commonly attached on sodium potassium ATPase beta-subunit, FGFR1 and FGF-23 is recognized by alpha-Klotho, the 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, ポスター発表、2013年、6月1日、神戸

④ Maeda Ryota, Imura Akihiro, Nabeshima Yo-ichi, Alpha-Klotho enables FGF23 signal transduction by recognition of a specific sugar motif to mediate mineral homeostasis, 文部科学省・科学研究費補助金・新学術領域研究「修飾シグナル病」第1回国際シンポジウム、ポスター発表、2013年、2月1日、東京

- ⑤ 鍋島陽一、前田良太、Alpha-Klotho/FGF23 複合体形成における糖鎖の役割 The role of sugar chain in functional FGF/alpha-Klotho interaction、第12回蛋白質化学会、招待講演、2012年、6月20日、名古屋
- ⑥ 前田良太、伊村明浩、クロトロ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年、1月28日、東京
- ⑦ 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ロー、第84回日本生化学会大会、ポスター発表、2011年、9月24日、京都
- ⑧ 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ロー、第84回日本生化学会大会、口演発表、2011年、9月24日、京都
- ⑨ 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ロ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年、9月22日、京都
- ⑩ Maeda Ryota、Imura Akihiro、Nagata Kazuhiro、Henrissat Bernard、Nabeshima Yo-ichi、Klotho acts as a novel lectin that binds terminal sulfated glucuronyl moieties、The 31st Naito Conference、ポスター発表、2011年、9月14日、札幌
- ⑪ 前田良太、グルクロン酸結合レクチンファミリーの新発見、文部科学省・科学研究費補助金・新学術領域研究「セルセンサー」第6回若手の会、口頭発表、2011年、3月18日、京都
- ⑫ 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 93rd annual meeting and EXPO、2011年、6月4日、ボストン、米国

[図書] (計2件)

- ① 前田良太、「構造細胞生物学」月刊ニューズレター、「クロトローの、グルクロン酸糖鎖およびFGF23との複合体としての構造解析」、文部科学省・科学研究費補助

金・新学術領域研究「細胞シグナリング複合体によるシグナル検知・伝達・応答の構造的基礎」事務局、2013年、47頁

- ② 前田良太、内藤時報 第89号、「責任と義務」～VARKI博士の講演を聴いて～、公益財団法人 内藤記念科学振興財団、2012年、99頁

[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: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2011-136719
出願年月日: 2011年6月20日
国内外の別: 国内

[その他]
ホームページ等
先端医療振興財団 先端医療センター
<http://www.ibri-kobe.org>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田良太 (RTYOA MAEDA)

研究者番号: 50432399

(2) 連携研究者

伊村明浩 (AKIHIRO IMURA)

研究者番号: 60362513

以上