

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：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790859

研究課題名（和文） 脂肪細胞新規膜タンパク質複合体の同定と代謝応答における意義の解明

研究課題名（英文） Identification and the functional analysis of FGF15/19- β Klotho system and β Klotho-associated protein complex in adipocytes

研究代表者

田中 智洋（TANAKA TOMOHIRO）

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：20402894

研究成果の概要（和文）：

β Klotho は肝臓、膵外分泌組織、脂肪組織に高いレベルの発現を示す膜タンパク質であるが、特に膵臓・脂肪組織における生理的意義には未解明の部分が多い。本研究では膵臓における FGF15/19- β Klotho システムの機能解析と脂肪組織における β Klotho 結合タンパク質の同定・機能解析を行った。リコンビナントヒト FGF19 をラットに静脈内単回投与すると膵液タンパク量、膵消化酵素濃度、膵液の SDS-PAGE 展開・銀染色により可視化される複数のタンパク質バンドの増加が観察され、FGF15/19 が膵液タンパク質分泌刺激作用を有することが明らかとなった。一方、マウス白色脂肪組織の免疫共沈－質量分析実験で同定した β Klotho 結合分子群のうち、膜輸送担体である 2 分子について、これらに対する抗体で免疫沈降し、 β Klotho に対する抗体でウェスタンブロットすることで結合の検証を行い、結合を再確認した。また 3T3-L1 細胞を用いて脂肪細胞への分化の各段階における 2 種類の輸送担体の遺伝子発現と基質輸送活性を測定した。その結果、高レベルの β Klotho 発現が検出される分化後期においても遺伝子発現と基質輸送活性が検出された。以上より膵外分泌能、脂肪細胞機能における β Klotho の生理的意義の一端が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

β Klotho is a membrane protein highly expressed in the liver, exocrine pancreas, and adipose tissue. We have previously shown that β Klotho is essential for FGF15/19 dependent negative feedback of bile acid synthesis from cholesterol. In this study, we find a potential role of FGF15/19 - β Klotho system in the secretion of lipase and other pancreatic enzymes. We furthermore identified and confirmed two β Klotho -binding transporters in white adipose tissue. Along with β Klotho, these membrane transporters are present and active in 3T3-L1 adipocytes, suggesting a role of β Klotho in the regulation of transporter activity in adipocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-------------|----------|-------------|
| 2010 年度 | 1, 900, 000 | 570, 000 | 2, 470, 000 |
| 2011 年度 | 1, 200, 000 | 360, 000 | 1, 560, 000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3, 100, 000 | 930, 000 | 4, 030, 000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：プロテオーム、脂肪細胞科学、シグナル伝達、エネルギー代謝、メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

β Klotho は肝臓、膵外分泌組織、脂肪組織に高いレベルの発現を示す膜タンパク質であるが、その生理的意義には未解明の部分が多い。研究代表者らはこれまでに、 β Klotho がマウス肝組織において FGF15、FGFR4 と結合し、胆汁酸合成酵素 Cyp7a1 の発現制御に必須の役割を果たすことを示した。一方、膵外分泌腺、脂肪組織における β Klotho の機能は全く未解明である。 β Klotho とアミノ酸配列上及びドメイン構造上高い相同性を有する α Klotho の研究成果により、 β Klotho は細胞膜上でタンパク質複合体を形成することにより FGF (fibroblast growth factor) の受容体共役分子ないしは膜輸送担体の活性制御分子として細胞生理機能制御を司ると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、膵臓および脂肪組織における β Klotho の機能を解明する目的で、膵液分泌における FGF15- β Klotho システムの意義と、脂肪細胞における β Klotho 結合膜輸送担体の探索・同定・機能解析を試みた。

3. 研究の方法

- (1) 膵臓における解析：SD ラットに予めカニューラを留置し、リコンビナントマウス FGF15 を静脈内単回投与し、膵液量、膵液タンパク質濃度、膵液消化酵素活性、膵液中のタンパク質組成について検討を行った。
- (2) 脂肪組織における解析：マウス白色脂肪組織の免疫共沈一質量分析実績により、 β Klotho 結合分子を探索し、そのうち膜輸送担体分子 A, B の 2 分子に特に着目し、3T3-L1 脂肪細胞を用いて遺伝子発現と輸送活性をラジオアイソトープラベルした輸送基質の取り込み活性により評価した。

4. 研究成果

- (1) 膵臓における解析：FGF19 の単回静脈内投与によりラット膵液のリパーゼ活性の増加が検出された。FGF による膵液中リパーゼ活性の増加は、以前より膵酵素分泌促進作用を有することが知られるコレシストキニンよりも遅く、投与約 45 分後がピークと考えられた。膵液を変性後に SDS-PAGE で展開すると、コントロール溶媒投与後の膵液と比較して、濃度が不変の分子と増加する分子との両者が存在

することが銀染色で確認された。

- (2) 脂肪組織における解析：マウス白色脂肪組織の免疫共沈実験により質量分析で同定した β Klotho 結合分子群のうち、膜輸送担体である A, B の 2 つについて、同じくマウスの白色脂肪組織のライセートを用いて① β Klotho の免疫共沈物を A, B のそれぞれに対する抗体でウエスタンブロットする実験 (順方向実験)、② A, B のそれぞれに対する抗体で免疫沈降した共沈物を β Klotho に対する抗体でウエスタンブロットする実験 (逆方向実験) を行った。全ての実験において免疫共沈物中に予想される分子のバンドが検出され、A, B のいずれについても β Klotho との結合が証明された。次に 3T3-L1 細胞を定法に従い脂肪細胞へ分化誘導し、分化過程における A, B の遺伝子発現と基質輸送活性を測定した。その結果、高いレベルでの β Klotho の発現が検出される分化後期を含むいずれの分化段階においても A, B の遺伝子発現と基質輸送活性が検出された。

以上より膵外分泌能、脂肪細胞機能における β Klotho の生理的意義の一端が明らかとなり、 β Klotho による脂質・エネルギー代謝の統一的制御原理の解明への足掛かりが得られた。

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 9 件)

1. O. Asai, K. Nakatani, T. Tanaka, H. Sakan, A. Imura, S. Yoshimoto, K.I. Samejima, Y. Yamaguchi, M. Matsui, Y. Akai, N. Konishi, M. Iwano, Y. Nabeshima, Y. Saito. 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
2. K. Tomiyama, R. Maeda, I. Urakawa, Y. Yamazaki, T. Tanaka, S. Ito, Y. Nabeshima, T. Tomita, S. Odori, K. Hosoda, K. Nakao, A. Imura, Y. Nabeshima. Relevant use of Klotho in FGF19 subfamily signaling in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107(4):1666-1671, 2010
3. S. Yasue, H. Masuzaki, S. Okada, T. Ishii, C. Kozuka, T. Tanaka, J.

- Fujikura, K. Ebihara, K. Hosoda, A. Katsurada, N. Ohashi, M. Urushihara, H. Kobori, N. Morimoto, T. Kawazoe, M. Naitoh, M. Okada, H. Sakaue, S. Suzuki, K. Nakao. Adipose tissue-specific regulation of angiotensinogen in obese humans and mice: Impact of nutritional status and adipocyte hypertrophy. *Am. J. Hypertens.* 23(4):425-431, 2010
4. S. Okada, C. Kozuka, H. Masuzaki, S. Yasue, T. Ishii-Yonemoto, **T. Tanaka**, Y. Yamamoto, M. Noguchi, T. Kusakabe, T. Tomita, J. Fujikura, K. Ebihara, K. Hosoda, H. Sakaue, H. Kobori, M. Ham, Y. S. Lee, J. B. Kim, Y. Saito, K. Nakao. Adipose-tissue-specific dysregulation of angiotensinogen by oxidative stress in obesity. *Metabolism* 59(9):1241-51, 2010
 5. T. Ishii-Yonemoto, H. Masuzaki, S. Yasue, S. Okada, C. Kozuka, **T. Tanaka**, M. Noguchi, T. Tomita, J. Fujikura, Y. Yamamoto, K. Ebihara, K. Hosoda, K. Nakao. Glucocorticoid reamplification within cells intensifies NFκB and MAPK signaling and reinforces inflammation in activated preadipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298(5):E930-E940, 2010
 6. 田中智洋, 鍋島陽一 心腎関連解明の新しい分子標的 α Klotho Cardiovascular Frontier Vol.3 No.1 : 30-37, 2012
 7. 田中智洋, 鍋島陽一 メタボリック症候群と病理 Klotho ファミリーによる代謝の統合的制御 病理と臨床 Vol.28 No.9 : 924-931, 2010
 8. 田中智洋, 益崎裕章, 中尾一和 「肥満症第2版-基礎・臨床研究の進歩」中樞メラノコルチン系 (POMC/α-MSH) 日本臨牀 68(Suppl. 2), 75-82, 2010
 9. 田中智洋, 益崎裕章, 細田公則, 中尾一和 メタボリックシンドロームのマスターレギュレーターとしての PPARγ 日本臨牀 68, 203-209, 2010

[学会発表] (計 6 件)

1. 田中智洋, 益崎裕章, 泰江慎太郎, 米本崇子, 荒井直樹, 富田 努, 藤倉純二, 海老原 健, 箕越靖彦, 細田公則, 中尾一和 マウス視床下部 CB1 受容体発現調節における高脂肪食とニコチンの影響 第 31 回日本肥満学会 (ポスター) 2010 年 10 月 1 日 (金) 前橋
2. 田中智洋, 小林加奈子, 鷺田美和, 鍋島陽一 哺乳類個体の代謝制御における β Klotho の機能解明を目指して 第 29 回日本内分泌学会 内分泌代謝学サマーセミナー (ポスター) 2011 年 7 月 8 日 (金) 仙台
3. 田中智洋 クロトローの分子機能から明らかとなるカルシウム・脂質の新しい制御メカニズム 第 45 回兵庫内分泌研究会 (教育講演) 2011 年 7 月 16 日 (土) 神戸
4. 田中智洋, 小林加奈子, 岡田定規, 中川真美, 鷺田美和, 斎藤能彦, 伊村明浩, 鍋島陽一 βKlotho 結合分子の同定と脂肪細胞機能制御における意義の探索 第 32 回日本肥満学会 (口演) 2011 年 9 月 23 日 (金) 淡路
5. 田中智洋 βKlotho による代謝制御の全貌解明を目指して 第 1 回 Metabolism Scientific Forum (口演) 2011 年 12 月 23 日 (金) 東京
6. 田中智洋 脂肪細胞は何を感じ、どう変化するか-β クロトロー分子の機能解析からのこころみ 文部科学省特別経費プロジェクト学術講演会 (招請講演) 2012 年 2 月 9 日 (木) 沖縄

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

○取得状況 (計 0 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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 智洋 (TANAKA TOMOHIRO)
公益財団法人先端医療振興財団・主任研究員
研究者番号：20402894

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし