

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14695

研究課題名(和文) Klothoを介したFGF23の機能発現に重要な新規糖鎖に関する研究

研究課題名(英文) Role of glycans in control of FGF23 and Klotho functions

研究代表者

岡 昌吾 (Oka, Shogo)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60233300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： Klothoは主に腎臓で発現し、カルシウムやリン、ビタミンDの調節に重要なタンパク質であり、その欠損により骨粗鬆症や動脈硬化などの人の老化症状と類似した症状を示すことが知られている。また KlothoはFGF23が腎臓で作用を発揮する際の共受容体として働くことが知られている。本研究では KlothoやFGF23の機能発現におけるHNK-1糖鎖とそれに関連する糖鎖の役割について解析を行なった。

研究成果の概要(英文)： Klotho is predominantly expressed in kidney and has important roles in regulation of mineral metabolism including calcium. Klotho is also known to act as a co-receptor for fibroblast growth factor 23 (FGF23). Mice lacking functional Klotho protein exhibit phenotypes resembling human aging. Klotho is a type I membrane protein with two glucosidase-like domains in an extracellular region. It is, however, still unclear how these glucosidase-like domains are utilized for the klotho function since the essential glutamate residues for enzymatic activity are not conserved in Klotho. In this study, we investigated the role of HNK-1 and its related glycans in the functional regulation for FGF23 and Klotho.

研究分野：生化学 糖鎖生物学

キーワード： Klotho FGF23 HNK-1糖鎖 腎臓 グルクロン酸転移酵素

1. 研究開始当初の背景

Klotho(KI)は主に腎臓で発現し、カルシウムやリン、ビタミンDの調節に重要なタンパク質である。また、その欠損により骨粗鬆症や動脈硬化などの人の老化症状と類似した症状を示すことが知られている(*Science*, 316, 1615, 2007)。KIはC末側に膜貫通領域と短い細胞質領域をもつ分子量約130 kDaのI型膜タンパク質で、N末端側にはグルコシダーゼに相同性を持つKL1, KL2のドメインを持つ。しかし、糖分解活性に必要とされるグルタミン酸が保存されていないことから実際にグルコシダーゼ活性を持つかどうかについての決定的な証拠は得られていない。

FGF23は骨細胞で産生され、主に腎臓に作用し、リン、ビタミンD代謝を調節するホルモンとして働くことが知られている全身性液性因子である(*J. Clin. Invest.* 113, 561, 2004)。その遺伝子欠損マウスはKI欠損マウスと良く似た表現型を示すことや、実際にFGF23が腎臓で機能するためには腎臓で発現するKIとの相互作用が重要であることが知られている。

申請者はKIの発見者である鍋島らのグループと共同で、FGF23上に硫酸化グルクロン酸を含む新規O型糖鎖(HNK-1様糖鎖)が存在し、KIとの相互作用に重要であること、また、KlothoはFGF23上の糖鎖だけでなくその機能発現の場である腎臓に存在する非硫酸化型HNK-1糖鎖も認識する可能性を示す結果を得ていた。

2. 研究の目的

HNK-1糖鎖は神経系で高発現する糖鎖で、糖鎖末端に硫酸化されたグルクロン酸を持つ特徴的な糖鎖である。申請者が中心になりその生合成機構や神経系での機能を明らかにしてきた。申請者はHNK-1糖鎖機能解析に必要な様々な分子ツール(生合成酵素であるグルクロン酸転移酵素や硫酸転移酵素の発現ベクターや遺伝子欠損マウス、また本糖鎖を認識する特異性の異なる抗体)を数多く有している。本研究では、この分子ツールを利用してKIの機能発現におけるFGF23上のHNK-1様糖鎖および腎臓の非硫酸化型HNK-1糖鎖と関係を明らかにすることを目的として研究を行なった。

3. 研究の方法

(1) FGF23上に発現するHNK-1様糖鎖の生合成酵素に関する解析

FGF23上に発現するHNK-1様糖鎖の解析では、FGF23が細胞内で切断によって不活性化されることを防ぐため、切断部位近傍の176および179番目のアルギニンをグルタミンに

変異させたFGF23の発現ベクターを使用した。COS細胞またはCHO細胞にFGF23を、様々な糖転移酵素とともに共発現させ、HNK-1糖鎖を認識する数種の抗体との反応性を指標にして解析を行った。

(2) KIに存在するグリコシダーゼ様領域に関する解析

KIは一回膜貫通型のタンパク質であるが、その膜貫通領域を、Fcで置換した分泌型Klotho(sKL-Fc)を安定的に発現するCHO培養細胞(京都大学医学部前田良太先生、伊村明浩先生から供与)を-MEM培地で培養することにより、培地中に分泌されたsKL-FcをProteinGカラムにより精製し、腎臓の組織への結合を解析した。

(3)免疫組織化学的解析

野生型(C57/BL6)マウス、腎臓の非硫酸化型HNK-1糖鎖の生合成酵素であるグルクロン酸転移酵素GlcAT-Sの遺伝子欠損マウス、ストレプトゾトシンを投与した野生型マウスに対し、4%パラホルムアルデヒドで還流固定したのち、腎臓を摘出し、腎臓切片を作成した。

(4)ストレプトゾトシン誘導性腎機能障害マウスの解析

ストレプトゾトシンは膵臓ランゲルハンス島細胞を特異的に破壊する薬剤で、投与マウスでは持続する高血糖により腎臓系球体に障害が発生し、腎機能が低下することが報告されている。様々な濃度のストレプトゾトシンを腹腔内に投与し、糖尿病の指標として血中グルコース濃度を、腎機能の評価として血中尿素窒素濃度(BUN値)を測定した。

4. 研究成果

(1) FGF23上に発現するHNK-1様糖鎖の生合成酵素に関する解析

家族性高リン血症性腫瘍状石灰沈着症(hyperphosphatemic familial tumoral calcinosis (OMIM 211900))は腎尿細管リン再吸収の亢進を伴う高リン血症と高活性化ビタミンD血症を特徴とし、その原因遺伝子としてはKI, FGF23, GALNT3が同定されている。GALNT3は、タンパク質のセリンまたはトレオニンにGalNAcを転移するO型糖鎖の生合成酵素であり、GALNT3がFGF23上の178番目のトレオニンにGalNAcを転移すると考えられている。そこで、まずFGF23とGALNT3を培養細胞に共発現させたところ、FGF23の分子量が増加し、糖鎖付加が亢進することが確認された。そこでGALNT3と共に様々なグルクロン酸転移酵素を発現させ、分子量変化を観察したが大きな変化は見られなかった。

また、HNK-1 糖鎖を認識する数種の抗体を用いて反応性を解析したが、抗体で検出される糖鎖は確認できなかった。したがって、FGF23 上の HNK-1 様糖鎖の生合成には現在知られているグルクロン酸転移酵素とは異なるものが用いられている可能性が示された。

(2) KI に存在するグリコシダーゼ様領域に関する解析

KI には細菌や植物の グリコシダーゼと相同性を持つ領域が 2 カ所存在するが、その酵素活性に重要とされるグルタミン酸が保存されていない。KI の酵素活性に関しては、シアリダーゼ活性やグルクロニダーゼ活性を持つとの報告もあるが、その活性は一般的な糖分解酵素に比べ非常に弱いことから、生体内で KI が糖分解酵素として働いているかどうかは疑問が残る。したがって、KI は糖鎖分解酵素ではなく、むしろグルクロン酸やシアル酸を認識するレクチンとして働く可能性が考えられた。そこで KI の膜貫通領域を、Fc で置換した分泌型 Klotho(sKL-Fc) を用いて野生型マウスの腎臓切片との反応性を見たところ、腎臓の非硫酸化型 HNK-1 糖鎖が発現している腎皮質の尿細管基底膜に sKL-Fc との反応性が確認された。また、この反応性が非硫酸化型 HNK-1 糖鎖依存性かどうかを確かめるために、非硫酸化型 HNK-1 糖鎖を欠損する(GlcAT-S 遺伝子欠損)マウスを用いて解析したところ、sKL-Fc との結合が大きく減少していた。したがって、KI は腎臓に存在する非硫酸化型 HNK-1 糖鎖にレクチンとして結合する可能性が示された。

(3) ストレプトゾトシン誘導性腎機能障害マウスの解析

-Klotho 遺伝子に変異を持つ -Klotho マウスでは、腎臓における非硫酸化型 HNK-1 糖鎖の発現が増加すること、また、自然老化マウスにおいても同様に非硫酸化型 HNK-1 糖鎖の発現が増加することがわかった。そこで、積極的に腎臓の機能障害を引き起こす処理(ストレプトゾトシン誘導性腎機能障害)を行ったところ、腎臓における非硫酸化型 HNK-1 糖鎖の発現が増加することがわかった。また、免疫染色により非硫酸化型 HNK-1 糖鎖の腎臓における発現を解析したところ、発現量が上昇しているだけでなく、局在の変化も認められた。したがって、腎機能低下と非硫酸化型 HNK-1 糖鎖発現には相関があることが確認された。

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 7件)全て査読あり

1. Tomioka M, Shimobayashi M, Kitabatake M, Ohno M, Kozutsumi Y, Oka S, Takematsu H. Ribosomal protein uS7/Rps5 serine-223 in protein kinase-mediated phosphorylation and ribosomal small subunit maturation. *Sci. Rep.*, 8, 1244. (2018) doi: 10.1038/s41598-018-19652-z.
2. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Fujishima A, Oka S, (他 16名). MiR30-GALNT1/2 Axis-Mediated Glycosylation Contributes to the Increased Secretion of Inactive Human Prohormone for Brain Natriuretic Peptide (proBNP) From Failing Hearts. *J. Am. Heart Assoc.*, 6, e003601. doi: 10.1161/JAHA.116.003601. (2017)
3. Morise J, Takematsu H, Oka S. The role of human natural killer-1 (HNK-1) carbohydrate in neuronal plasticity and disease. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1861, 2455-2461. (2017) doi: 10.1016/j.bbagen.2017.06.025
4. Watanabe H, Okahara K, Naito-Matsui Y, Abe M, Go S, Inokuchi J, Okazaki T, Kobayashi T, Kozutsumi Y, Oka S, Takematsu H. Psychosine-triggered endomitosis is modulated by membrane sphingolipids through regulation of phosphoinositide 4,5 bisphosphate production at the cleavage furrow. *Mol. Biol. Cell.* 27(13):2037-50. doi: 10.1091/mbc.E15-08-0555. (2016)
5. Kouno T, Akiyama N, Fujieda K, Nanchi I, Okuda T, Iwasaki T, Oka S, Yukioka H. Reduced intake of carbohydrate prevents the development of obesity and impaired glucose metabolism in ghrelin O-acyltransferase knockout mice. *Peptides*, 86, 145-152. (2016)
6. Kouno T, Akiyama N, Ito T, Okuda T, Nanchi I, Notoya M, Oka S, Yukioka H. Ghrelin O-acyltransferase knockout mice show resistance to obesity when fed high-sucrose diet. *J. Endocrinol.*, 228, 115-125. (2016) doi: 10.1530/JOE-15-0330.
7. Dystroglycan glycosylation: structure, synthetic pathway, and in vivo role in the brain development. Nakagawa N and Oka S. *Journal of Japanese Biochemical Society* 88(4):

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 楠 進, 松井太郎, 濱田征宏, 桑原 基, 森瀬譲二, 岡 昌吾 末梢神経障害にみられる HNK-1 エピトープに対する抗体の微細反応性の臨床的意義について 糖鎖免疫 Glyco-Immunology2018 2018年2月19日-20日 東京医科歯科大学(東京)
2. 岡 昌吾 イオンチャネル型グルタミン酸受容体に観察される糖鎖の厳密な発現制御 2017年度生命科学系学会合同年次大会(第90回日本生化学大会) 2017年12月6日(水)~9日(土) 神戸ポートアイランド(兵庫)
3. 糸瀬邦之, 岡 昌吾, 竹松 弘 スフィンゴ脂質を介した熱ストレス細胞での転写制御メカニズム 2017年度生命科学系学会合同年次大会(第90回日本生化学大会) 2017年12月6日(水)~9日(土) 神戸ポートアイランド(兵庫)
4. 北野仁望, 森瀬譲二, 岡 昌吾 ストレプトゾトシン誘導性腎機能障害マウスにおける非硫酸化型 HNK-1 糖鎖の発現解析 第57回日本臨床化学会年次学術集会 2017年10月6日(金) 8日(日) 北海道大学(北海道)
5. Kandel Babu Munal, 緑川 良介, 岡 昌吾, 川崎 ナナ, 高倉 大輔, 高宮 考悟 AMPA 型グルタミン酸受容体の N 型糖鎖修飾は、4 量体形成と細胞表面への移送を制御する 第40回日本神経科学大会 2017年7月20日(木)-23日(日) 幕張メッセ(千葉)
6. 森瀬譲二, 鈴木健一, 北川 英佳, 山本 采季, 竹内祐介, 楠見明弘, 竹松 弘, 岡 昌吾 第18回関西グライコサイエンスフォーラム N 型糖鎖欠損体による AMPA 型グルタミン酸受容体の機構解析 2017年5月13日(土) 京都大学(京都)
7. 山本 采季, 森瀬 譲二, 竹松 弘, 岡 昌吾 特定の N 型糖鎖が AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット GluA1 の細胞内輸送を制御する. 第35回日本糖質学会年次大会 2016年9月1-3日 高知市文化プラザ かるぼーと(高知)
8. 中村 綾沙, 森瀬 譲二, 竹松 弘, 岡 昌吾 胎生期に Tenascin-C 上に発現する HNK-1 糖鎖の機能解析 第89回日本生化学会大会 2016年9月25-27日 仙台

国際センター(宮城)

9. Jyoji Morise, Saki Yamamoto, Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Hiromu Takematsu, and Shogo Oka, Specific N-glycans regulate cell surface expression of AMPA-type glutamate receptors. ICS 2016 (XXVIII International Carbohydrate Symposium)
10. Hiroshi Watanabe, Toshihide Kobayashi, Jin-ichi Inokuchi, Toshiro Okazaki, Shogo Oka and Hiromu Takematsu Psychosine-triggered endomitosis to produce multiploid cells. 2016 Korea-Japan Bioactive Lipid Joint Symposium May 11-13 2016, BAREVE Hotel in Jeju island South Korea

〔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
<http://oka-lab.hs.med.kyoto-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
岡 昌吾 (OKA, Shogo)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号: 60233300
- (2) 研究分担者 なし
()
研究者番号:
- (3) 連携研究者 なし
()
研究者番号:
- (4) 研究協力者 なし
()