

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19510227

研究課題名（和文）

線維芽細胞成長因子（FGF）21の機能発現に関わる分子の同定

研究課題名（英文）

Identification of the fibroblast(FGF)21 regulator

研究代表者

山本 雅哉 （ YAMAMOTO MASAYA ）

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20446115

研究成果の概要：

内因性分子の挙動が不安定であることが判明し、まず、局在を含めたタンパク分子の挙動に着目した。生化学的な解析から肝臓、膵臓、小腸と限られた発現臓器の中で組織特異的な糖鎖修飾を受けること、また、免疫組織学的解析から肝臓では微絨毛に極性を持って分布すること、膵臓ではβ細胞にてよくインスリン顆粒と共局在することを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：線維芽細胞増殖因子、情報伝達、代謝調節、糖尿病、膵臓β細胞

## 1. 研究開始当初の背景

長らく不明であったFGF21の機能が明らかになりつつあり、FGFの名称と異なる代謝制御への関与が示唆された。我々はFGF21による脂肪細胞における糖取り込みの亢進が、FGF受容体1C型に脂肪細胞特異的に発現する膜タンパクβKlothoが共役因子として結合

することで可能になる分子機構を明らかにした。一方、膵臓β細胞においてFGF受容体1C型特異的に機能を阻害することでII型糖尿病が誘導されることが示されている。しかし、その発症機作は今でも不明のままである。我々は、膵臓でやはりβKlothoが発現していることに注目し、FGF受容体1C型・β

Klotho 複合体と、それを介して情報伝達が可能になる FGF21 の機能が II 型糖尿病発症機作に関わっていると仮定した。

Fig. 1: 膵臓  $\beta$  細胞での FGF21 機能発現モデル



## 2. 研究の目的

上記モデル (Fig. 1)、すなわち FGF 情報伝達系が  $\beta$  KL を介して代謝調節に関与する分子機構の解析、さらには糖尿病などの代謝異常疾患の関わりを明らかにする事を目的とする。

## 3. 研究の方法

培養細胞系、中でもマウス膵臓  $\beta$  細胞である min6 細胞に着目し、FGF 受容体 1C 型・内因性  $\beta$  Klotho 複合体と FGF21 刺激依存的に結合する分子の探索を免疫沈降法により試みる。また iRNA 法による  $\beta$  Klotho の発現阻害時に FGF21 刺激で誘導されなくなる遺伝子を探索することで FGF21 の標的遺伝子の同定を試みる。

## 4. 研究成果

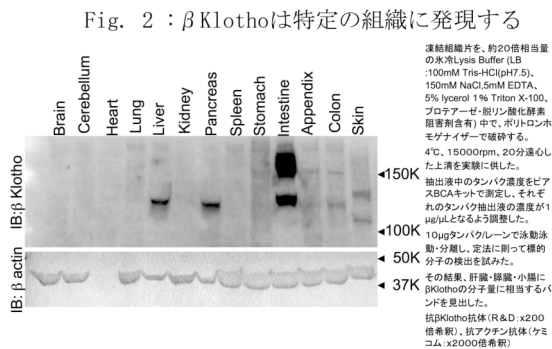
### (1) 不安定な $\beta$ KL の動態

膵臓  $\beta$  細胞由来細胞株として min6 細胞に着目したが、細胞の性質が安定性・均一性に欠けることから再現性のある結果を得るに至らずにいる。問題の原因を検討するため、膵臓と 4 ライン入手した min6 間で、FGF21 の機能発現に必要な FGF 受容体と  $\beta$  KL のタンパク発現を対比したところ、いずれにおいても FGF 受容体の発現が安定しているのに対して、 $\beta$  KL の発現は同一セルライン内ですら著しく変動・低下していることがわかった。 $\beta$  KL は FGF 受容体と複合体を形成することで FGF21 との結合・代謝に関わる機能を発揮する一方、一般的な FGF の増殖活性を抑制する可能性が示唆されている。すなわち、不安定な  $\beta$  KL の動態が FGF21 の機能発現に直接影響を与えている可能性、ひいては  $\beta$  KL 型糖尿病の可能性を念頭に置いて内因性  $\beta$  KL の動態解析を試みた。

### (2) 内因性 $\beta$ KL タンパクの組織分布

内因性  $\beta$  KL について、RNA の発現解析は試みられているが、タンパクレベルでの解析は未だなされていない。抗  $\beta$  KL 抗体を用いてマウス組織における発現分布をウエスタンブロットティングにより確かめたところ、肝臓、膵臓、小腸に強い陽性反応が認められた (Fig 2)。それぞれの組織における陽性反応を示す分子量が若干異なるが、肝臓と膵臓では免疫沈降後の糖鎖切断処理で等しい分子量に移行することから、組織で異なる糖鎖修飾を受けることがわかった ('09 年、全国解剖組織学会発表)。また、小腸で観察された高分

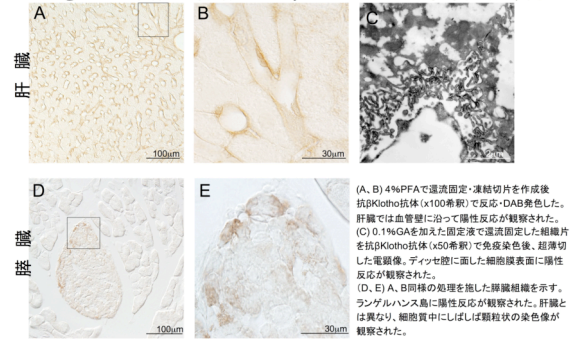
子の内因性  $\beta$  KL シグナルについては免疫沈降がうまく行かず、糖鎖修飾との関連が確認できなかった。しかし、myc 標識した強制発現系においても観察されることから、異なるスプライシングに由来する遺伝子産物でないことがわかる。小腸のタンパク抽出物でうまく行かなかった免疫沈降・糖鎖切断実験を myc 抗体を用いて再度試みる予定である。



(3)  $\beta$  KL はディッセ腔 (肝臓) 側への極性分布を示す。

肝臓での  $\beta$  KL の組織・組織内分布の詳細な解析を進めた所、ディッセ腔に面した微絨毛に主に分布することが解った (Fig. 3 : 上段)。胆汁代謝との関連からの予測と異なり、血管に沿って分布することは、FGF21 のホルモン様機能を考察すると極めて理にかなったものと言える。以前に発表した脂肪細胞での FGF21 の機能解析から、恐らく肝臓でも同様に糖・脂質代謝に関与する機能を発揮しているものと予測される。

Fig. 3 肝臓・膵臓での  $\beta$  Klothoの発現分布解析



(4)  $\beta$  KL のインスリン分泌顆粒への局在ウエスタンブロット (Fig. 2) で示された

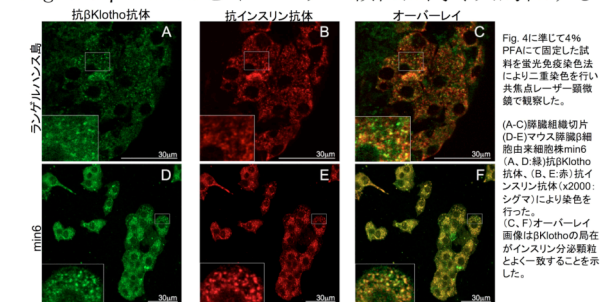
膵臓での  $\beta$  KL の発現が、単免疫染色像によりランゲルハンス島に局在していることを明らかにした。in situ hybridization による膵臓での  $\beta$  KL の発現解析では外分泌部での発現が報告されているが、報告されているデータではランゲルハンス島でも発現が観察される。

しかし、最終的にタンパク産物として蓄積されるのはランゲルハンス島と考えられる。

更に、驚くべきことに抗インスリン抗体との2重染色から  $\beta$  KL がインスリン分泌顆粒上に分布していることが明らかになった (Fig. 4)。

膜上に存在する複合体としてホルモン様因子 FGF21 の受容体として機能するとした仮説に説明が必要となるが、インスリン分泌に

Fig. 4 :  $\beta$  Klothoとインスリン顆粒は良く共局在する



対して直接的な機能を  $\beta$ KL が果たしている可能性が示されるに至った。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 1 件）

山本雅哉、亀高諭、和栗聡、発表題目：

マウス組織における  $\beta$ Klotho の発現分布解析

学会名：第 114 回日本解剖学会・全国学術総会 2009 年 3 月 29 日 岡山理科大学, 岡山

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 雅哉 (YAMAMOTO MASAYA)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20446115

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし