

受賞者

田中 智洋

京都大学大学院医学研究科 腫瘍生物学講座

研究テーマ

エイジングと代謝異常を結ぶ分子：

Klothoファミリーの機能の解明とメタボリックシンドローム治療への応用

1. 背景・目的

α Klotho(α Kl)は早期老化様表現型を示す変異マウスの原因遺伝子産物として1997年に偶然発見された(Kuro-o et al. *Nature*, 1997)。 α Klはグリコンダーゼ類似配列を有する1型膜タンパク質であるが、酵素活性に必須のアミノ酸に変異を有することから α Klのタンパク質としての機能は最近まで不明であった。我々の研究室では最近、 α Klの発現臓器である脳脈絡叢のライセートを独自の抗 α Kl抗体で免疫沈降することにより共沈物として内因性 α Kl結合分子、Na,K-ATPase (NaK)の同定に成功した(Imura et al. *Science*, 2007)。 α Kl/NaK複合体はエンドソーム膜に存在するが、細胞外Ca濃度が低下すると速やかに細胞膜に移動する。野生型マウス由来の脈絡叢では、低Ca刺激は α Kl/NaK複合体の細胞膜移行の促進によりNaKの膜表面量・ポンプ活性を増加させる。これに対し、 α k遺伝子欠損マウス(α k KO)の脈絡叢では、低Ca下でのNaKの膜表面への移動が認められず、NaKの活性増加も生じない。さらに、 α Klを欠損した細胞では低Ca応答性のCa輸送の障害を認めること、 α k KO由来の副甲状腺では低Ca応答性の副甲状腺ホルモン(PTH)分泌が減弱していることから、低Ca下での α Kl依存性NaKリクルートメントは脈絡叢・腎尿細管のCa上皮輸送および副甲状腺におけるPTHの分泌に必要であると考えられる。一方、 α KlはFGF23、FGF受容体とも結合し、培養細胞の系においてFGF受容体シグナル伝達に必須の役割を果たす (Urakawa et al., *Nature*, 2006)。

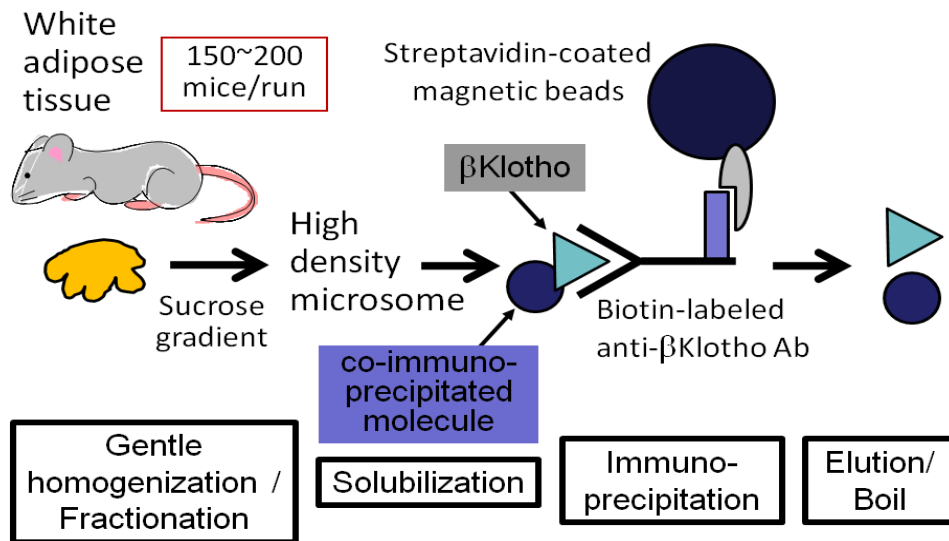
β Klotho(β Kl)は α Klとアミノ酸配列上高い相同性を有するタンパク質で肝臓、脂肪組織、膵臓に発現を認める(Ito et al. *Mech Dev*, 2000)。また、 β k遺伝子欠損マウス(β k KO)は肝臓における胆汁酸合成の亢進を呈する(Ito et al. *J Clin Invest*, 2005)ことから、 β Klが脂質代謝に重要である可能性が考えられた。しかし、 β Klの生理的意義は全く未解明である。そこで、本研究では*in vivo*の組織を用いて、 β Kl結合分子の探索を行い、マウス個体における β Klの分子機能の解明に挑んだ。

2. 方法

① C57BL/6マウスの肝臓および白色脂肪組織を用いて β Klの発現量をウエスタンブロット法により検討した。また3T3-L1脂肪細胞の分化過程、マウス及びヒト初代培養脂肪細胞の分化前後における β Klの発現をウエスタンブロット法ないしRT-PCR法により検討した。

② マウス(150~200匹)の精巣上体・腎周囲脂肪組織をホモジナイズ後、シヨ糖密度勾配遠心法により β Klを高濃度に含有する膜分画を精製、可溶化した上でmockおよび抗 β Kl抗体により免疫沈降した。 β Klの共沈物をSDS-PAGEで展開し、全ゲル上のタンパク質を質量分析法(LC/MS/MS)により網羅的に解析した(図1)。また β k KOおよび対照C57BL/6マウス各150匹~200匹の白色脂肪組織をソースとして抗 β Kl抗体により免疫沈降し、同様の解析を行った。これら実験より得られたデータをMascot[®]以上の信頼度で解析し、結合候補タンパク質のリストを抽出、再現性と存在量により絞り込みを行った。

図1 マウス個体の脂肪組織からの免疫沈降によるβKl結合タンパク質の探索プロトコル



3. 研究成果

①マウス組織におけるβKl発現量を検討したところ、単位タンパク質量当たりのβKlの発現量は白色脂肪組織において肝臓(図2)、および膵臓よりも多いことが分かった。また3T3-L1脂肪細胞の分化過程において、βKlタンパク質の発現はポストコンフルエントの前駆脂肪細胞の時点で既にごくわずかに認められ、分化誘導開始4日目以降に明らかな増加を示した(図3)。βKlタンパク質の発現レベルは少なくとも分化開始10日目まで維持された。3T3-L1細胞の系で認められた脂肪細胞分化に伴うβKl発現量の増加は、マウス初代培養前駆脂肪細胞あるいはヒト初代培養前駆脂肪細胞の分化誘導前後でのmRNA量の検討においても再現された。以上の結果より、βKlの発現は特に白色脂肪組織において高いレベルであり、また脂肪細胞の分化過程において著明に増加することが明らかとなった。

図 2

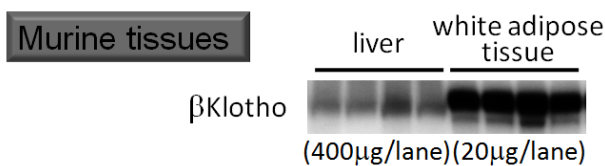
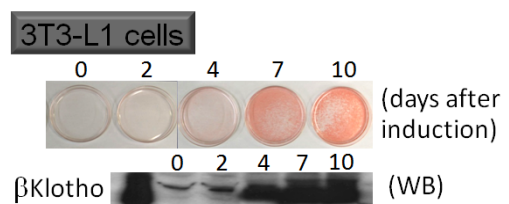


図 3



②ホモジナイズ条件、膜分画の調整条件、可溶化条件、モノクローナル抗体の作製・精製と選択、免疫沈降物の溶出条件などの最適化を行い、マウス150~200匹の脂肪組織から約100ng相当のβKlタンパク質を免疫沈降することが可能となった。このことにより、少なくとも質量比でbaitであるβKlの1/100量程度存在する共沈物が得られると考えられ、これは質量分析の感度上解析可能な量であると考えられた。この条件で得られた免疫沈降物をSDS-PAGEで展開、CBB染色によりβKlの存在を確認した上で、LC/MS/MSによる全ゲル解析を行った。今回開発した上記方法により、ネガティブコントロールであるmock抗体の免疫沈降物あるいはβkl KO由来の免疫沈降物との比較実験を合計4回反復し、さらにβKlタンパク質の異なる領域をエピトープとする別の抗体を用いることで、再現性を持って検出される約10個の共沈タンパク質の同定に成功した。

4. まとめ

β Klは特に成熟脂肪細胞・白色脂肪組織において高レベルの発現が観察される。質量分析法による網羅的解析により *in vivo* の白色脂肪組織で β Kl と結合しているタンパク質群の同定に成功した。このタンパク質群には細胞骨格タンパク質、細胞膜の裏打ちタンパク質、広義のトランスポーター等機能性膜タンパク質が含まれており、これらタンパク質が細胞膜近傍で β Kl を含む大きな複合体を形成することで脂肪細胞の新たな機能を担っている可能性が示唆される。今後はタンパク質複合体の各構成因子および複合体を形成することの意義に着目して生化学的、細胞生理学的検討を加え、Klothoファミリー分子が担う新たな生体恒常性維持機構のパラダイムの提唱を目指したい。

5. 発表論文、参考文献

発表論文

Tomiyama K, Maeda R, Yamazaki Y, Urakawa I, Tanaka T, Imura A, Ito S, Nabeshima Y, Nabeshima Y. Analogous roles of α and β -Klotho in the circulating metabolic FGF signaling systems in vivo.

In revision, 2009

参考文献

Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 390:45-51, 1997

Imura A, Tsuji Y, Murata M, Maeda R, Kubota K, Iwano A, Obuse C, Togashi K, Tominaga M, Kita N, Tomiyama K, Iijima J, Nabeshima Y, Fujioka M, Asato R, Tanaka S, Kojima K, Ito J, Nozaki K, Hashimoto N, Ito T, Nishio T, Uchiyama T, Fujimori T, Nabeshima Y. α -Klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science*. 316:1615-1618, 2007

Ito S, Kinoshita S, Shiraishi N, Nakagawa S, Sekine S, Fujimori T, Nabeshima YI. Molecular cloning and expression analyses of mouse betaklotho, which encodes a novel Klotho family protein.

Mech Dev. 98:115-119, 2000

Ito S, Fujimori T, Furuya A, Satoh J, Nabeshima Y, Nabeshima Y. Impaired negative feedback suppression of bile acid synthesis in mice lacking betaKlotho. *J Clin Invest*. 115:2202-2208, 2005

Tsujiikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y. Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system.

Mol Endocrinol. 17:2393-2403, 2003

Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*. 444:770-774, 2006