

## 寿命制御因子 Klotho によるナトリウム依存性リン輸送調節機序 —腎臓におけるリン輸送制御—

宮本 賢一, 木戸 慎介

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

**概要** リンは生体に必須のミネラルであるが、その代謝機構は長年謎のベールに包まれていた。最近、fibroblast growth factor 23 (FGF23) がリン代謝調節因子として同定され新しい展開がなされている。FGF23 は常染色体優性遺伝性低リン血症性クル病 (ADHR) の責任遺伝子として同定され、腎臓に作用してナトリウム依存性リントランスポーターを抑制する因子である。また、同時に腫瘍性骨軟化症 (TIO) の産生するリン利尿因子であることが明らかにされた。TIO は腫瘍随伴症候群の一つで、血清カルシウムおよび副甲状腺ホルモン濃度は正常であるが、血清  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  濃度の低下と尿中リン排泄亢進を特徴とする低リン性クル病／骨軟化症である。原因は、腫瘍からの FGF23 の過剰分泌と想定されている。このように FGF23 は長年不明であったリン代謝異常症の原因因子として登場した。一方で、その受容体は不明であったが、寿命制御因子として知られる klotho が FGF23 の受容体である事が証明された。Klotho 遺伝子欠損マウス (kl/kl) は、短命で老化兆候を示し、ミネラル代謝異常が、その背景に存在する。本研究では、klotho によるヒト腎臓における中心的なナトリウム依存性リン輸送担体 NaPi-IIc に対する制御機能について検討を行なった。

本研究では NaPi-IIc における N 型糖鎖の役割と分泌型 Klotho による NaPi-IIc の機能調節について検討した。それらの結果、NaPi-IIc の糖鎖は、細胞の膜局在に重要な役割を演じていた。また、分泌型 klotho は、NaPi-IIc に対して直接的な阻害作用を有しており、これらは、Klotho の有するシアリダーゼ活性やグルクロニダーゼ活性に依存していなかった。次に、Klotho の腎臓における局在について検討を加えた。

kl/kl マウスにおける、Klotho 発現回復臓器の検討を行ったところ、低リン食による発現回復は腎臓に見られ、mRNA 発現およびタンパク発現は、野生型マウスと kl/kl マウス双方とも低リン食群で増加することを確認した。このことから、kl/kl マウスにおいて、低リン食により血中 Pi 濃度が正常化され Klotho の発現が増加すると、欠損時に見られた表現型の一部が改善される可能性が示された。低リン食飼育時の腎臓における Klotho 発現増加部位を免疫組織化学染色により詳細に検討したところ、野生型マウス群では主に遠位尿細管に発現していることが確認されたが、低リン食群ではコントロールリン食群と比較して近位尿細管基底膜側の発現が増加しているという結果が得られた。次に近位尿細管基底膜における Klotho は急激なリン負荷を与えることで細胞内に移行し、尿中に分泌される可能性が示唆された。この分泌された Klotho が Npt2c を調節しうる可能性が考えられた。以上より、Klotho は低リン食飼育により近位尿細管基底膜に発現が有意に増加し、急激なリンの刺激により細胞内を經由し刷子縁膜側に移行し、尿中に分泌される過程で Npt2c を調節し、リン排泄を促す可能性が考えられた。

### 1. 研究目的

リンは生体に必須のミネラルであるが、その代謝機構は長年謎のベールに包まれていた。最近、fibroblast growth factor 23 (FGF23) がリン代謝調節因子として同定され新し

い展開がなされている。FGF23 は常染色体優性遺伝性低リン血症性クル病 (ADHR) の責任遺伝子として同定され、腎臓に作用してナトリウム依存性リントランスポーターを抑制する因子である。また、同時に腫瘍性骨軟化症 (TIO)

の産生するリン利尿因子であることが明らかにされた。TIOは腫瘍随伴症候群の一つで、血清カルシウムおよび副甲状腺ホルモン濃度は正常であるが、血清  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  濃度の低下と尿中リン排泄亢進を特徴とする低リン性クル病／骨軟化症である。原因は、腫瘍からの FGF23 の過剰分泌と想定されている。このように FGF23 は長年不明であったリン代謝異常症の原因因子として登場した。一方で、その受容体は不明であったが、寿命制御因子として知られる klotho が FGF23 の受容体である事が証明された。Klotho 遺伝子欠損マウス (kl/kl) は、短命で老化兆候を示し、ミネラル代謝異常が、その背景に存在する。本研究では、klotho による腎臓ナトリウム依存性リン輸送担体の制御機能について解明を行なう。これらの研究を通じて、寿命制御におけるナトリウム依存性リン輸送体の役割を解明する。

## 2. 研究方法

### (1) 細胞の培養

袋ネズミ腎近位尿細管由来 (opossum kidney; OK) 細胞、DMEM/F12 (SIGMA) に 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (P/S; Invitrogen)、10% Fetal bovine serum (FBS; Invitrogen)、15 mM HEPES-KOH (pH 7.4) を加えた血清培地とともに、37°C、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーターで培養した。継代は 3~4 日間隔で subconfluent 時に Trypsin/EDTA を用い  $1.5 \times 10^5$  個、 $3.0 \times 10^5$  個/10 cm dish で行なった。

### (2) マウス NPT2c 野生型 (WT) 発現プラスミドの作製

coding 領域全長を含むマウス NPT2c WT+pBluescript SK (-) を template とし、N 末端に緑色蛍光タンパク (EGFP) tag が融合する pEGFP-C1 vector (Clontech) に構築し、塩基配列を確認後、NucleoBond Xtra Midi (MACHEREY-NAGEL) を用いて精製した (構築したクローンを NPT2c WT+pEGFP-C1 とする)。糖鎖変異体 (N264Q, N267Q, N299Q, 2NQ, 3NQ) の作製は、PCR 法を用いて、変異部位の導入を行なった。

### (3) フクロネズミ腎近位尿細管細胞 (OK 細胞) における NPT2c WT および糖鎖変異体の発現

生細胞観察には、35 mm glass bottom dish (MatTek) に細胞数  $2.7 \times 10^5$  個/dish でまき、subconfluent まで培養した細胞を PBS で 2 回洗浄し、P/S を含まない medium に変更した後、transfection を行なった。transfection は Lipofect

AMINE2000 (Invitrogen) を用い、添付のプロトコールに従って行ない、4-6 時間後に通常の medium に変更した。

Western Blot、リン輸送活性の測定および免疫染色解析には、12-well plate を用いて細胞数  $0.5 \times 10^5$  個/well でまき、免疫染色解析のみ well 内にカバーガラス (Matsunami) をしき、その plate 上に細胞数  $0.5 \times 10^5$  個/well でまいた。また、Blue native-polyacrylamide gel 電気泳動解析には 6-well plate を用いて、細胞数  $1.2 \times 10^5$  個/well でまいた。subconfluent まで培養し、上記と同様に transfection を行なった。transfection してから 24-48 時間培養後、各実験を行なった。

### (4) 免疫染色解析

細胞を氷冷した PBS で 3 回洗浄後、glass 裏面を拭き取り新しい 12-well plate に移した。3% paraformaldehyde/PBS にて 10 分間室温で固定、PBS で 3 回洗浄し、20 mM L-Glycine/PBS で処理した。PBS で 2 回洗浄し、0.05% saponin/PBS を 30 分間室温で処理し、PBS 中に 5 分間室温で細胞を浸し洗浄した。1% BSA/PBS を用いてブロッキング (30 分間、室温) し、0.2% BSA/PBS で希釈した一次抗体を 1 時間室温で反応させ、0.01% saponin/PBS で 2 回、PBS で 1 回、それぞれ 5 分間浸し洗浄した。0.2% BSA/PBS で希釈した二次抗体を 1 時間室温で反応させ、0.01% saponin/PBS で 2 回、滅菌 MilliQ 水で 1 回、それぞれ 5 分間浸し洗浄した。風乾後、Aqua PolyMount (Polyscience) を用いてスライドガラス上にカバーガラスを固定し、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica, TCS SL) にて、細胞を観察した。アクチン検出には 568-phalloidin (Molecular Probes; 1: 100) を用い、ER マーカー検出には一次抗体として抗 ERp29 polyclonal 抗体 (Gene Tex; 1: 500) を反応させ、二次抗体として Alexa568-ウサギ IgG (Molecular Probes; 1: 100) を用いた。NPT2c 検出には、一次抗体として抗 FLAG-M2 monoclonal 抗体 (SIGMA; 1: 100) を反応させ、二次抗体として、Alexa488-抗マウス IgG (Molecular Probes; 1: 100) を用いた。

### (5) OK 細胞における $^{32}\text{P}$ を用いたリン輸送活性の測定

リンを含まない uptake solution (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 2.8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 mM HEPES-Tris, pH 7.5) で細胞を 3 回洗浄し、0.1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.5)、1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$   $^{32}\text{P}$  を添加した uptake solution を 500  $\mu\text{l}$  加え、6 分間細胞にリンを取り込ませた。6 分後、氷冷し

た stop solution (137 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.2, 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7.5)を加えて反応を止め、その stop solution で3回洗浄した。細胞を NaOH 400  $\mu\text{l}$  に溶解し、その内 20  $\mu\text{l}$  を Duplicate で用いて、BCA protein Assay kit (Pierce)によるタンパク定量を行なった。残り 360  $\mu\text{l}$  は アクアゾル II (PACKARD)を混合し、液体シンチレーションカウンター LSC-6100 (Aloka)にて放射活性を測定した。リン輸送活性は nmol/mg/6 min、または WT の活性を 100 として% (% of WT) で示した。

#### (6) Total cell lysate の調製

細胞を TBS (pH 7.5) で 2 回洗浄し、最終濃度が 0.5% nonidetP-40、1 mM PMSF になるよう添加した TBS で細胞を回収した。22G の針でホモジナイズして遠心 (10,000  $\times$  g, 2 分間, 4°C) し、上清を採取した。回収した lysate はタンパク質濃度を測定後、一定の濃度に調整し SDS-PAGE、Western Blot 解析に用いた。

#### (7) Western Blot

一定濃度に調整したタンパク質溶液に 6  $\times$  Sample buffer (1 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 20% glycerol, 1% Bromophenol Blue, 12%  $\beta$ -mercaptoethanol を含む) を 1/6 量混合し、熱処理 (3 分間, 95°C) した後、8% SDS-polyacrylamide gel にて電気泳動し、PVDF 膜 (Immobilon-P, Millipore) に転写した。PVDF 膜を 5% スキムミルク (in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20; TBST) 中でインキュベート (1 時間, 室温) してブロッキングし、一次抗体として 1% スキムミルク (in TBST) で希釈した抗 EGFP monoclonal 抗体 (Clontech; 1: 5,000) または抗 actin monoclonal 抗体 (Chemicon; 1: 6,000; 内部標準として使用) と反応 (一晩, 4°C) させ、二次抗体として希釈した抗マウス IgG-HRP (Jackson ImmunoResearch; 1: 10,000) と反応 (1 時間, 室温) させ、Immobilon Western (Millipore) を用いてシグナルを検出した。

#### (8) 動物実験

動物実験は徳島大学動物実験委員会の許可のもと、徳島大学動物実験指針に従って行った。Klotho 変異ヘテロマウス (+/kl) は日本クレア株式会社で購入した。このヘテロマウスを交配し、野生型 (++) および Klotho 変異マウス (kl/kl) を得た。C57BL/6 野生型マウス (WT マウス) は、日本チャールズリバー株式会社より購入した。マウスは明暗サイクル (8:00-20:00) と温度湿度が一定の部屋でプラス

チックケージ内にて飼育した。

#### (9) 慢性 Pi 負荷実験

各マウスを食餌中 Pi 含量の異なる以下の実験食と水道水の自由摂取により飼育した。

下記の実験食は OYC 改変 AIN93G 精製試料飼料 (ORIENTAL YEAST CO. Ltd. Tokyo) を基に作製した。

Low Pi diet (LP) 群: (0.02% Pi, 0.6% Ca diet)

Control Pi diet (CP) 群: (0.6% Pi, 0.6% Ca diet)

High Pi diet (HP) 群: (1.2% Pi, 0.6% Ca diet)

野生型 (++) および kl/kl マウスは生後 4 週で離乳をおこない、離乳後 LP 群および CP 群に分けて LP 群は 3 週間、CP 群は 1 週間飼育した後解析を行った。また、Klotho の切断・分泌の検討で用いる WT マウスに関しては生後 8 週で LP 群、CP 群および HP 群に分けて 1 週間飼育し解析を行った。

#### (10) 急性リン負荷実験

生後 9 週雄の WT マウスに 1 週間、9:00-11:00 の間 LP 食を与え、食餌時間制限のトレーニングを行った。その後リン負荷当日の 9:00 に与える餌を HP 食に変更した Acute HP (AHP) 群と、そのコントロールとしてリン負荷当日の餌も LP 食とした Chronic LP (CLP) 群の 2 群に分け、それぞれ 11:00 となった時点で採尿および解剖を行った。

#### (11) 腎臓 Whole Homogenate 調製および Western Blotting 解析

腎臓の Whole Homogenate は、マウスをエーテル麻酔下で開腹・採血した後、腎臓を摘出し精製をおこなった。採取した腎臓に 500  $\mu\text{l}$  のホモジネートバッファー (5 mM Tris-HCl/pH 7.5, 250 mM sucrose, 0.1 mM PMSF) を加え、ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。このホモジネート液を 735g で 5 分遠心し、その上清を Whole Homogenate とした。調製した Whole Homogenate にサンプルバッファーを同量混合し、95°C で 5 分間加熱後、氷冷した。1 ウェルにタンパク含量が 30  $\mu\text{g}$  となるよう調整し、8% SDS-Poly-Acrylamide Gel で分離し、Immobilon-P; polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore, Billerica, MA) に電氣的に転写した。転写後のメンブレンを 5% スキムミルク/TBST (Tris-base, NaCl pH 7.61/Tween 20) を用いて室温で 1 時間ブロッキングし、4,000 倍希釈の 3.3 mg/ml のラット抗 Klotho 抗体 KM2076 と共に 4°C で一晩反応させた。その後 5,000 倍希釈の Horseradish

peroxidaseにより標識された抗ラットIgG抗体(Millipore)と室温で1時間反応させ、Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate(Millipore)を用いて化学発光させて、フィルムHyperfilmMP(GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)に感光させ検出した。内部標準として5,000倍希釈のマウス抗actin抗体(Millipore)を使用し、二次抗体として20,000倍希釈のHRP標識した抗マウスIgG抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. Pennsylvania, USA)を用いた。各タンパクのKlotho発現量はImage Jにより数値化した後、数値化したActinにより補正し算出した。

### (12) Dot BlotによるKlothoの検出

採取した尿1μlをPVDF膜に滴下し、Western Blotting解析と同様の方法により、ブロッキングおよび検出をおこなった<sup>(10)</sup>。尿のKlotho分泌量は検出されたバンドをImage Jにより数値化した後、尿中クレアチニン濃度により補正し算出した。Klotho抗体はKM2076(Transgenic社)から入手した。

## 3. 研究結果

### (1) 近位尿細管細胞およびXenopus oocytesにおける

#### KlothoによるNaPi-IIcの制御機構

袋ネズミ腎近位尿細管由来OK細胞、およびアフリカツメガエル卵母細胞に、NaPi-IIcを過剰発現させ検討を行った(図1参照)。その結果、OK細胞において、分泌型klotho(sKL)の添加は、その濃度依存的にNaPi-IIc発現により亢進したリン輸送活性を低下させた。一方、アフリカツメガエル卵母細胞を用い、sKLの効果を観察したが、sKLによるリン輸送活性の阻害は、NaPi-IIaに対しては観察されなかった。しかし、NaPi-IIcに対してはsKLによる阻害効果が有意に観察された。

次に、NaPi-IIcはN型糖鎖修飾蛋白質であることより、NaPi-IIcの有する糖鎖の役割について検討した。マウスNaPi-IIcには3カ所の糖鎖負荷部位(264N, 267N, 299N)が存在する。各種糖鎖変異体を、OK細胞に発現させ、その局在や機能を調べた。それらの結果、糖鎖負荷部位3カ所(3NQ)すべてに変異を導入した場合には、細胞膜発現が抑制されたが、1カ所の変異体では、膜局在に大きな変化は観察されなかった(図1)。また、卵母細胞を用いたナトリウム依存性リン輸送活性においても、糖鎖負荷部位

3カ所を変異させ場合には、活性の著しい低下が観察された(図2)。次に、分泌型klotho(sKL)の添加による、リン輸送活性阻害および細胞膜発現量をそれぞれ、測定した結果、sKLの添加により、有意にリン輸送活性の阻害効果が確認された。しかし、糖鎖負荷部位を2カ所変異させた場合には、阻害効果は低下した。これらの結果より、NaPi-IIc糖鎖が細胞内局在並びにリン輸送活性に重要であること、およびsKLにはNaPi-IIcに対する阻害効果があることが明らかとなった(図2参照)。

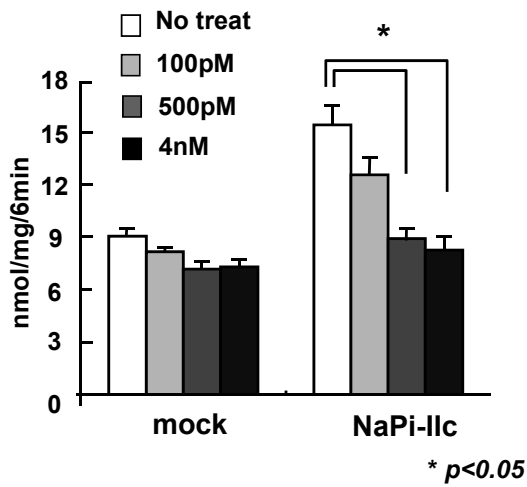
### (2) 糖鎖変異体に対するsKLの効果

次に、分泌型Klotho(sKL)のNaPi-IIc糖鎖変異体に対する作用について検討したところ、OK細胞および卵母細胞の両実験系とも分泌型Klotho処理によりリン輸送活性が有意に低下した。次に、分泌型Klothoの機能の1つとして、シアリダーゼ活性が報告されている。そこで、シアリダーゼ処理によりNaPi-IIcリン輸送活性が、どのように変化するか調べた。その結果、シアリダーゼ処理によりリン輸送活性が有意に上昇したのに対し、分泌型Klothoはシアリダーゼ阻害剤による作用を受けなかったことから、NaPi-IIcに対する分泌型Klothoの阻害作用はシアリダーゼ活性非依存的であることが示された。またNaPi-IIc糖鎖付加変異体では分泌型Klotho(sKL)の作用が消失したことから、分泌型Klotho(sKL)は糖鎖を介してNaPi-IIcの機能を調節していることが示唆された。これらの結果より、分泌型Klothoは、糖鎖付加を有するNaPi-IIcを阻害することが確認された(図3)。一方、分泌型klothoによるNaPi-IIaの阻害活性は、観察されなかった。

### (3) Klothoの局在について

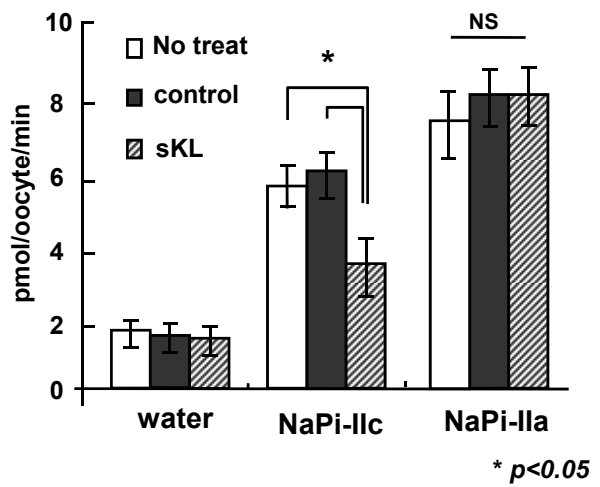
Klothoは主に腎臓および脳に発現していることが知られており、kl/klマウスを低リン食(LP)で飼育するとKlothoの発現が腎で回復する。LP食飼育した際のKlotho発現部位を検討すべく、野生型マウスおよびkl/klマウスの腎臓、脳、肝臓、脾臓、小腸を用いてPCR法でKlotho mRNA発現を検討した。その結果、LP食によりKlothoのmRNA発現が増加を示したのは腎臓と、わずかに脳でも確認された。この傾向はkl/klマウスのみでなく野生型マウスでも確認された。続いて、LP食飼育時の腎臓Whole Homogenateを用いてWestern Blotting解析を行ったところ、コントロールリン食(CP)群と比較してLP群では野生型マウスのKlothoタンパク発現量が増加傾向を示し、また、CP

**A (OK cells)**



**KL反応条件 : 37°C, 16hr**

**B (*Xenopus* oocyte)**



**KL反応条件 : 500pM, RT, 1hr**

図 1. OK 細胞およびアフリカツメガエル卵母細胞における NaPi-IIc に対する分泌型 klotho (sKL) の効果。NaPi-IIc を発現させた OK 細胞 (A) および卵母細胞 (B) を用いて、分泌型 klotho によるリン輸送活性阻害について調べた。

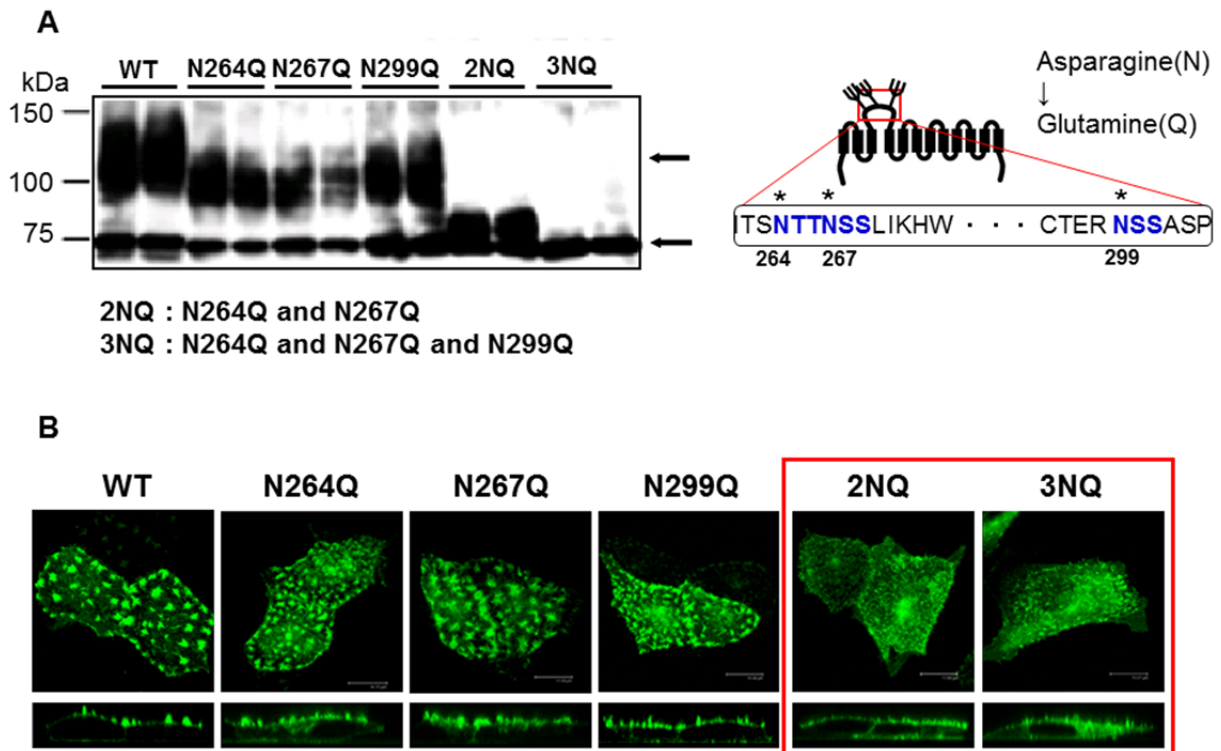


図 2. 各種糖鎖付加部位変異体 NaPi-IIc の細胞内局在について。推定される糖鎖付加部位に変異を導入した各種クローン (N264Q, N267Q, N299Q, 2NQ, 3NQ) を、それぞれ OK 細胞に発現させ、GFP を指標に、その局在性を検討した。2NQ は、2カ所の糖鎖付加部位の変異を有しており、3NQ は、3カ所すべてに変異を導入したクローンである。

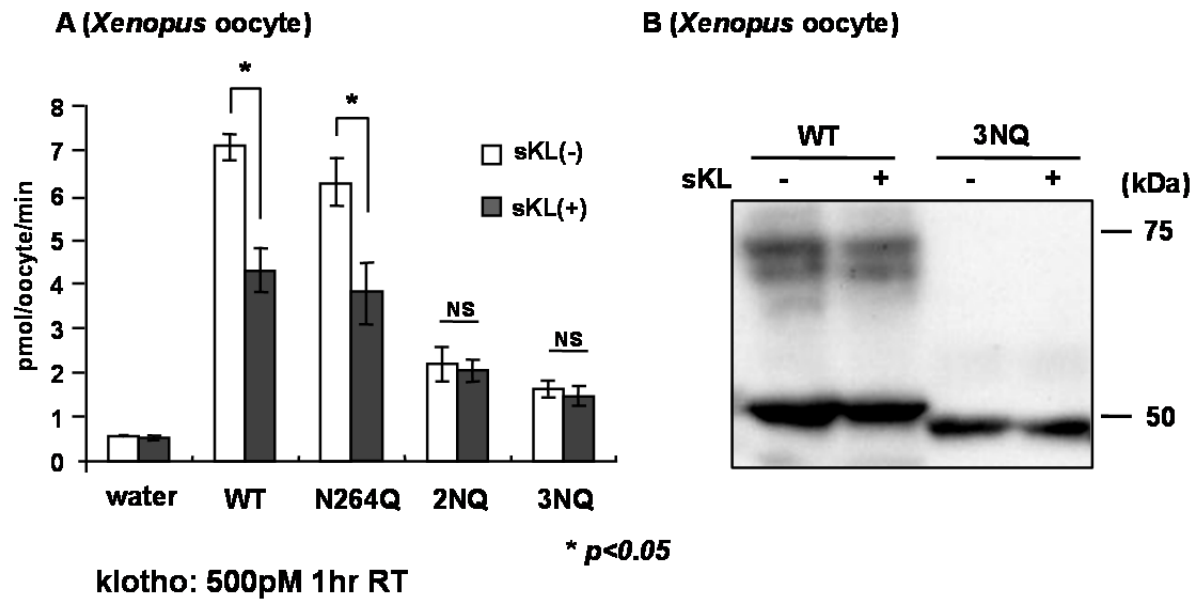


図3. 各種糖鎖付加部位変異体 NaPi-IIc の輸送機能および蛋白量に対する sKL の効果。推定される糖鎖付加部位に変異を導入した各種クローン (N264Q, N267Q, N299Q, 2NQ, 3NQ) を、それぞれアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、sKL の添加によるリン輸送活性への影響を調べた (A)。また、sKL を添加した後の卵母細胞膜を用いて、NaPi-IIc 蛋白量を測定した (B)。

群と比較して LP 群では kl/kl マウスの Klotho タンパク発現量が有意に高い値を示した。しかし、kl/kl マウスの LP 群は野生型マウスの CP 群と比較すると有意に低い値を示した。

野生型マウス CP 群では、従来までの報告通り、Klotho が主に遠位尿細管に発現していることが確認されたが、近位尿細管にもわずかにその発現を確認できた。野生型マウス LP 群では近位尿細管基底膜における発現が著しく増加していることを確認できた。kl/kl マウス CP 群では、従来までの報告通り、Klotho の発現がほとんど検出できなかったが、LP 群では、遠位尿細管では著しく、近位尿細管ではわずかに Klotho の発現が回復していることを確認できた。

#### (4) 急性食餌リン負荷によるリン代謝変動および Klotho の局在および分泌への影響

急性食餌リン負荷による血中および尿中リンの変動と Klotho の局在および分泌量への影響について、野生型マウスを用いて検討した。LP 食で 1 週間飼育したマウスを、低リン負荷 (CLP) 群、および急性高リン負荷 (AHP) 群に分け、2 時間食餌リン負荷を行った後、血中および尿中リンの測定と尿の Dot Blot 解析を行った。その結果、血中

Pi 濃度は CLP 群と比較して AHP 群では有意に高い値を示した。また、尿中リン排泄も AHP 群では有意に高い値を示した。尿中への Klotho 分泌量を調べたところ、CLP 群と比較して AHP 群では尿中増加傾向を示した。また、免疫組織化学染色により CLP 群および AHP 群の Klotho 局在部位を詳細に検討したところ、CLP 群では Klotho が近位尿細管基底膜側および遠位尿細管刷子縁膜側に検出されたが、AHP 群では遠位尿細管刷子縁膜側に局在しており、CLP 群と比較すると近位尿細管では細胞内に点状に散在していることが確認された。

#### 4. 考察

血中リン濃度の維持には、腎臓近位尿細管に発現する 2 型 Na 依存性リン酸トランスポーター (NaPi-II) が重要な役割を担う。NaPi-II サブファミリーである NaPi-IIc は近年、家族性低リン血症性くる病 (HHRH) の責任遺伝子であることが報告され、ヒト腎臓における中心的なリン輸送体と考えられる<sup>(14)</sup>。一方で、これらの中心的な調節因子として、FGF23 が明らかにされた<sup>(6)</sup>。我々は、FGF23 によるリン/ビタミン D 代謝制御、とくに、腎近位尿細管における NaPi-II に対する機能調節について研究を推進してきた

(6-18)。それらの結果、FGF23 は、NaPi-IIc に対して非常に強力な阻害効果を有していることが予想された(6-18)。Klotho (kl/kl) マウスは、多彩な早期老化症状を呈し、カルシウム/リン代謝異常を示すモデルである(19)。以前、我々は Klotho マウス (kl/kl) に見られる高リン血症の発症機構について検討を加え、本マウスの高リン血症の原因は、腸管及び腎におけるリン吸収・再吸収を担う NaPi-IIa、NaPi-IIc トランスポーターの異常な発現増加であることを報告した(10)。kl/kl マウスは FGF23 の血中濃度が非常に高値であるが、Klotho 発現が抑制されていることより、FGF23 の作用に対する抵抗性が観察された(10)。これらの事実より、FGF23/klotho システムはリン代謝に深く関与する調節系と考えられた。

FGF23/Klotho システムによる Pi 排泄機序を理解するには、大きな矛盾点があった。それは、FGF23 は骨細胞より分泌され、Klotho の局在部位である腎遠位尿細管に作用して、近位尿細管 NaPi-II を抑制するが、どのような機序により FGF23 のシグナルが遠位尿細管から近位尿細管に伝達されるかは、不明であった。

遠位尿細管細胞基底膜に局在する膜型 Klotho は生体内において FGF23、FGF レセプターと結合し、何らかの調節因子を介して、NaPi-II の発現調節を行っている(20)。一方、膜型 Klotho の細胞外領域は、切断され血液、尿中へ分泌され、分泌型 Klotho として独自の機能を持つことが示唆されている(19, 21)。最近、分泌型 Klotho は N 型糖鎖を介して NaPi-IIa の機能を調節している事が報告された(21)。そこで本研究では NaPi-IIc における N 型糖鎖の役割と分泌型 Klotho による NaPi-IIc の機能調節について検討した。それらの結果、分泌型 klotho は、NaPi-IIc に対して直接的な阻害作用を有しており、これらは、Klotho の有するシアリダーゼ活性やグルクロニダーゼ活性に依存していなかった。今後、Klotho による NaPi-II の阻害効果に関して詳細な解析が必要と考えられる。

次に、Klotho の局部位について、詳細な検討を加えた。Klotho は主要な発現部位が腎遠位尿細管および脳の脈絡叢であることが知られているが、低リン食で飼育した際の発現回復部位に関しては詳細に報告されていない(22)。そこで、Klotho 発現回復臓器の検討を行ったところ、低リン食による発現回復は腎臓に見られ、mRNA 発現および

タンパク発現は、野生型マウスと kl/kl マウス双方とも低リン食群で増加することを確認した。このことから、kl/kl マウスにおいて、低リン食により血中 Pi 濃度が正常化され Klotho の発現が増加すると、欠損時に見られた表現型の一部が改善される可能性が示された。低リン食飼育時の腎臓における Klotho 発現増加部位を免疫組織化学染色により詳細に検討したところ、野生型マウス CP 群では主に遠位尿細管に発現していることが確認されたが、低リン食群ではコントロールリン食群と比較して近位尿細管基底膜側の発現が増加しているという結果が得られた。次に、リン利尿を誘導する為に急性的にリン負荷を行なった場合の Klotho 分泌量を検討した。その結果、低リン負荷群と比較して、急性高リン負荷群では尿中の Klotho 分泌量が増加傾向を示すことが確認された。また、腎臓の免疫組織化学染色で Klotho の発現を確認したところ、低リン食群では腎近位尿細管の基底膜側に発現している Klotho が、高リン負荷群では近位尿細管内部に点状に散在していることが確認された。このことから、急激なリンの負荷により近位尿細管基底膜側に存在していた Klotho が細胞内に移行し、さらには尿中に分泌される可能性が示唆された。

今回の検討により、近位尿細管基底膜における Klotho は急激なリン負荷を与えることで細胞内に移行し、尿中に分泌される可能性が示唆された。この分泌された Klotho が Npt2a および Npt2c を調節しうる可能性が考えられる。詳細なメカニズムは明らかではないが、近位尿細管基底膜側から細胞内を経由して刷子縁膜側に移行した Klotho が Npt2c の不活性化を行うことで、リン排泄を促すことが考えられ、急激なリン負荷に応答する Klotho の新たな作用機序となりうる可能性が示唆された。一方、遠位尿細管における Klotho は低リン食および高リン食群で局在の変動が見られなかった。遠位尿細管に発現する Klotho は、FGF23 のシグナル伝達を介した活性型ビタミン D 抑制とリン排泄促進が主な作用であると考えられる。

以上をまとめると、Klotho は低リン食飼育により近位尿細管基底膜に発現が有意に増加し、急激なリンの刺激により細胞内を経由し刷子縁膜側に移行し、尿中に分泌される過程で Npt2c を調節し、リン排泄を促す可能性が考えられた(図 4)。

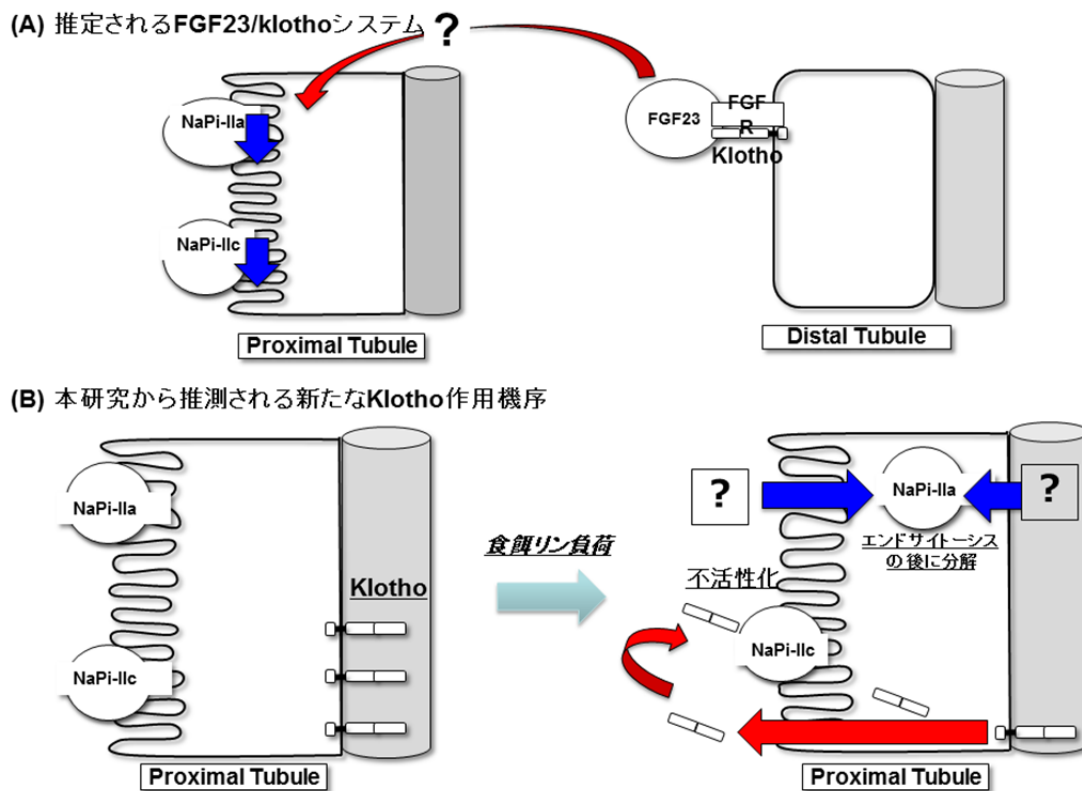


図4. 予想される FGF23/klotho システムによるリン利尿の分子機序。(A) FGF23 によるリン利尿効果は、遠位尿細管に発現する FGFR1 および Klotho を介するシグナルにより、何らかの因子を介して近位尿細管に発現する NaPi-IIa、NaPi-IIc に伝えられる。これらの因子については、明らかにされていない。(B) 一方、本研究により、Klotho は近位尿細管基底膜にも発現しており、低リン食摂取などの条件下にはその発現量が増大する。また、高リン負荷により、基底膜に局在する Klotho は、細胞内に移行し、管腔側に移動し、尿中に分泌される。このような移行にともない、管腔側の sKlotho は、NaPi-IIc を阻害することで、リン利尿が起こる。

## 5. 今後の課題

FGF23/Klotho システムは、慢性腎臓病 CKD において、早期からそのシグナル系が亢進し、リン蓄積亢進や異所性石灰化などに関与する重要なリン調節系である。この早期 CKD におけるリン代謝異常の改善は、CKD の進行や心血管障害を予防する上でも重要な事項である。FGF23 の分泌機序の解明や、Klotho を介するリン利尿機序の解明は、今後、CKD の予防や治療においても重要な事項と考えられる。

## 文献等

- 1) Segawa H, Kaneko I, Takahashi A, Kuwahata M, Ito M, Ohkido I, Tatsumi S, Miyamoto K. (2002) Growth-related renal type II Na/Pi cotransporter. J Biol Chem, 277, 19665-19672.
- 2) Miyamoto K, Ito M, Tatsumi S, Kuwahata M, Segawa H. (2007) New aspect of renal phosphate reabsorption: the type IIc sodium-dependent phosphate transporter. Am J Nephrol 27, 503-515, review
- 3) Miyamoto K, Haito-Sugino S, Kuwahara S, Ohi A, Nomura K, Ito M, Kuwahata M, Kido S, Tatsumi S, Kaneko I, Segawa H. (2011) Sodium-dependent phosphate cotransporters: lessons from gene knockout and mutation studies. J Pharm Sci 100; 3719-30, Review
- 4) Lederer E, Miyamoto KI. (2012) Clinical consequences of mutations in sodium phosphate cotransporters. Clin J Am Soc Nephrol in press
- 5) Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, and Yamashita T. Cloning and characterization of FGF23 as a



- causative factor of tumor-induced osteomalacia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98: 6500-6505, 2001.
- 6) Saito H, Kusano K, Kinoshita M, Ito H, Hirata M, Segawa H, Miyamoto K. (2003) Human fibroblast growth factor-23 mutants suppress Na<sup>+</sup>-dependent phosphate co-transport activity and 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> production. *J Biol Chem*, 278, 2206-2211.
  - 7) Tenenhouse HS, Martel J, Gauthier C, Segawa H, Miyamoto K. (2003) Differential effects of Npt2a gene ablation and the X-linked Hyp mutation on renal expression of type IIc Na/phosphate cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol*. 285: F1271-F1278.
  - 8) Saito H, Maeda A, Ohtomo S, Hirata M, Kusano K, Kato S, Ogata E, Segawa H, Miyamoto K, Fukushima N. Circulating FGF-23 is regulated by 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and phosphorus in vivo. *J Biol Chem*. 2005 280(4): 2543-9
  - 9) Ito M, Sakai Y, Furumoto M, Segawa H, Haito S, Yamanaka S, Nakamura R, Kuwahata M, Miyamoto KI. (2005) Vitamin D and phosphate regulate fibroblast growth factor-23 in K562 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 288, E1101-9, 2005
  - 10) Segawa H, Yamanaka S, Ohno Y, Onitsuka A, Shiozawa K, Aranami F, Furutani J, Tomoe Y, Ito M, Kuwahata M, Tatsumi S, Imura A, Nabeshima Y, Miyamoto K. (2006) Correlation between hyperphosphatemia and type II Na/Pi cotransporter activity in klotho mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 292, F769-F779
  - 11) Segawa H, Onitsuka A, Kuwahata M, Hanabusa E, Furutani J, Kaneko I, Tomoe Y, Aranami F, Matsumoto N, Ito M, Matsumoto M, Li M, Amizuka N, Miyamoto K. (2009) Type IIc sodium-dependent phosphate transporter regulates calcium metabolism. *J Am Soc Nephrol* 20: 1-4-113
  - 12) Segawa H, Aranami F, Kaneko I, Tomoe Y, Miyamoto K. (2009) The roles of Na/Pi-II transporters in phosphate metabolism. *Bone* 11: S2-7. Review
  - 13) Segawa H, Onitsuka A, Furutani J, Kaneko I, Aranami F, Matsumoto N, Tomoe Y, Kuwahara M, Ito M, Matsumoto M, Li M, Amizuka N, Miyamoto K. (2009) Npt2a and Npt2c in mice play distinct and synergistic roles in inorganic phosphate metabolism and skeletal development. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F671-8.
  - 14) Tomoe Y, Segawa H, Shiozawa K, Kaneko I, Tominaga R, Hanabusa E, Aranami F, Furutani J, Kuwahara S, Tatsumi S, Matsumoto M, Ito M, Miyamoto K. (2010) Phosphaturic action of fibroblast growth factor 23 in Npt2 null mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 298; F1341-50.
  - 15) Masuda M, Yamamoto H, Kozai M, Tanaka S, Ishiguro M, Takei Y, Nakahashi O, Ikeda S, Uebanso T, Taketani Y, Segawa H, Miyamoto K, Takeda E. Regulation of renal sodium-dependent phosphate co-transporter genes (Npt2a and Npt2c) by all-trans-retinoic acid and its receptors. *Biochem J* 429; 583-92.
  - 16) Ito M, Sakurai A, Hayashi K, Ohi A, Kangawa N, Nishiyama T, Sugino S, Uehata Y, Kamahara A, Sakata M, Tatsumi S, Kuwahata M, Taketani Y, Segawa H, Miyamoto K. (2010) An apical expression signal of the renal type IIc Na<sup>+</sup>-dependent phosphate cotransporter in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 299; F245-54.
  - 17) Ohi A, Hanabusa E, Ueda O, Segawa H, Horiba N, Kaneko I, Kuwahara S, Mukai T, Sasaki S, Tominaga R, Furutani J, Aranami F, Ohtomo S, Oikawa Y, Kawase Y, Mada NA, Tachibe T, Kakefuda M, Tateishi H, Matsumoto K, Tatsumi S, Kiso S, Fukushima N, Jishage K, Miyamoto K. (2011) Inorganic phosphate homeostasis in sodium-dependent phosphate cotransporter Npt2b<sup>+/-</sup> mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 301; F1105-13.
  - 18) Haito-Sugino S, Ito M, Ohi A, Shiozaki Y, Kangawa N, Nishiyama T, Aranami F, Sasaki S, Mori A, Kiso S, Tatsumi S, Segawa H, Miyamoto KI. (2012) Processing and stability of type IIc sodium-dependent phosphate cotransporter mutations in patients with hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria. *Am J Physiol Cell Physiol* 302: C1316-30

- 19) 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, and Nabeshima YI. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390: 45-51, 1997.
- 20) Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, and Yamashita T. *Klotho* converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 444: 770-774, 2006.
- 21) Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS, Rosenblatt KP, Baum MG, Kuro-o M, and Moe OW. *Klotho*: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24: 3438-3450, 2010.
- 22) Morishita K, Shirai A, Kubota M, Katakura Y, Nabeshima Y, Takeshige K, and Kamiya T. The progression of aging in *klotho* mutant mice can be modified by dietary phosphorus and zinc. *The Journal of nutrition* 131: 3182-3188, 2001.

# Regulation of Sodium Dependent Phosphate Cotransporters by Klotho, an Antiaging Factor Control of Renal Phosphate Reabsorption

Ken-Ichi Miyamoto, Shinsuke Kido

Department of Molecular Nutrition Institute of Health Biosciences,  
The University of Tokushima Graduate School

## Summary

The *Klotho* gene was identified from a mouse strain in which *Klotho* mutant (kl/kl) mice present senescence manifestation such as growth retardation, short lifespan, osteoporosis, ectopic calcification because of autosomal recessive inheritance. In addition, the serum phosphate, calcium and 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> levels are significantly increased in kl/kl mice relative to that of wild type mice. Overexpression of Klotho extends lifespan in mice and, the serum phosphate level is significantly lower relative to that of wild-type mice. Thus, it is guessed that Klotho is an important factor of phosphate homeostasis and these mineral abnormalities cause senescence manifestation of kl/kl mice.

Fibroblast growth factor 23 (FGF23) acts on kidney to induce phosphaturia by suppressing NaPi-IIa and NaPi-IIc and to reduce serum 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>, which in turn reduces phosphate absorption from intestine. FGF23 acting through FGF receptor (FGFR), and FGF23 require transmembrane form of Klotho for binding to FGFR because of any known FGFR had extremely low affinity to FGF23. Thus, transmembrane form of Klotho function as an obligatory co-receptor for FGF23. In addition, a cross-talk between the distal and proximal tubules was postulated for FGF23-induced phosphaturia based on the original notion that Klotho is exclusively expressed in the distal convoluted tubule and Pi reabsorption and regulation solely resides in the proximal tubule.

On the other hand, the extracellular domain of transmembrane form of Klotho (soluble Klotho) is cleavage from membrane and which is detected in blood, urine and cerebrospinal fluid and may function as an endocrine and/or paracrine hormone. The soluble Klotho protein cannot function as a coreceptor for FGF23 because Klotho protein alone cannot bind to FGF23 with high affinity, suggesting that soluble Klotho may have function independent of FGF23. Soluble Klotho has amino acid sequence homology to family 1 glycosidase.

NaPi-IIc is principal phosphate transporter in kidney and plays an important role in renal phosphate handling and may be a key determinant of plasma phosphate level in humans. NaPi-IIc may be an important potential target molecule of soluble Klotho, because NaPi-IIc is a membrane glycoprotein and plays an important role in phosphate homeostasis, but effect of soluble Klotho for NaPi-IIc has not clarified. To reveal the relationship between phosphate homeostasis and Klotho, it is necessary to clarify the effect of soluble Klotho for NaPi-IIc.

In the present study, we investigated the role of *N*-glycan chain of NaPi-IIc and the effect of soluble Klotho

on NaPi-IIc function in OK cells and *Xenopus laevis* oocyte. Based on a secondary structure model of the human and mouse NaPi-IIc, we identified the three consensus *N*-glycosylation sites (Asn-264, Asn-267, and Asn-299) in the putative second extracellular domain. Mutation of *N*-glycosylation sites of NaPi-IIc decreased the protein expression on the apical membrane, and reduced its membrane stability and phosphate transport activity. Next, we investigated the effect of soluble Klotho on the function of NaPi-IIc in *Xenopus* oocytes. The soluble Klotho elicited a dose-dependent decrease in the NaPi-IIc activity. However, soluble Klotho did not affect the double (2NQ) and triple *N*-glycosylation mutants (3NQ) of NaPi-IIc. In addition, immunohistochemical analysis showed the presence of Klotho protein in the basolateral membrane of proximal tubular epithelial cells induced by the feeding of a low Pi diet. After feeding of a high Pi diet, we found the elevation of soluble Klotho levels in the urine. These data suggest that the appearance of Klotho in the proximal lumen can be due to cleavage and /or secretion by the proximal tubule, or possibly by transcytosis of plasma- or distal tubule-derived Klotho. Finally, the present study indicates that soluble Klotho functions from the outside of cell as a humoral factor and by modifying *N*-glycan chain of NaPi-IIc at the cell surface.