

論文内容の要旨

論文題目 翻訳後修飾による Fibroblast Growth Factor (FGF) 23 蛋白の活性調節

指導教員 藤田 敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

内科学(内分泌病態学)専攻

氏名 鈴木 尚宜

【背景】

線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor : FGF)23 は、FGF ファミリーの一員として同定された蛋白である。FGF23 は常染色体優性低リン血症性くる病/骨軟化症 (autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia : ADHR)の原因遺伝子として同定され、腫瘍性くる病/骨軟化症 (tumor-induced rickets/osteomalacia : TIO)の低リン血症惹起液性因子であることも報告された。FGF23 は腎近位尿管での 2a、2c 型ナトリウム-リン共輸送体の発現抑制と、25-水酸化ビタミン D-1 α -水酸化酵素の発現低下を介し、血中リン濃度を低下させる。

FGF23 ノックアウトマウスが著明な高リン血症を起こすことや、正常健常人において高リン負荷や低リン食で、FGF23 血中濃度がそれぞれ上昇、低下することから、FGF23 は血中リン濃度の生理的調節因子と考えられる。FGF23 は、Klotho と 1 型 FGF 受容体の複合体に作用し、ERK リン酸化や *early growth response 1 (Egr-1)* 遺伝子発現の誘導などを惹起する。

一部の FGF23 蛋白は、RXXR を認識するスブチリシン様プロテアーゼにより ¹⁷⁹Arg と ¹⁸⁰Ser の間でプロセッシングを受け、不活性なフラグメントに分解される(図 1)。

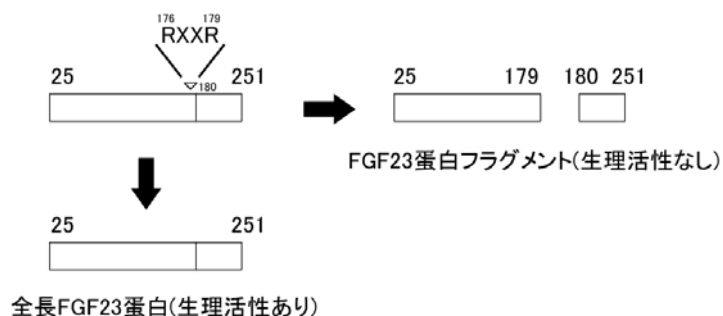


図 1: FGF23 蛋白のプロセッシング

RXXR を認識するスブチリシン様プロテアーゼにより ¹⁷⁹Arg と ²⁰⁰Ser の間でプロセッシングを受け、不活性なフラグメントとなる。

— リン代謝異常と FGF23 —

ADHR や TIO に加え、X 染色体優性低リン血症性くる病/骨軟化症 (X-linked hypophosphatemic rickets/osteomalacia : XLH)や常染色体劣性低リン血症性くる病/骨軟化症 (autosomal recessive hypophosphatemic rickets/osteomalacia : ARHR)も過剰な FGF23 活性により惹起されることが報告された。逆に、尿細管でのリン再吸収亢進による高リン血症と、高 1,25-水酸化ビタミン D 血症、異所性石灰化を特徴とし、ADHR や ARHR、XLH、TIO と鏡像をなす疾患として、家族性高リン血症性腫瘍状石灰沈着症 (familial hyperphosphatemic tumoral calcinosis : FTC)が知られている。FTC の原因遺伝子としては *FGF23* 遺伝子と、UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase3 (ppGaNTase-T3)をコードする *UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase3* (*GALNT3*)遺伝子、および *Klotho* 遺伝子が報告されている。このうち ppGaNTase-T3 蛋白は、ムチン型 O 型糖鎖付加を媒介する酵素である。*GALNT3* 遺伝子変異による FTC では、FGF23 蛋白のプロセッシングが亢進し、生理活性のある全長 FGF23 蛋白が減少することが明らかにされている。したがって、FGF23 蛋白への O 型糖鎖付加は、FGF23 蛋白活性に重要な意義を持っているものと考えられる。

— FGF23 蛋白への糖鎖付加 —

野生型 FGF23 蛋白は、培養液中では生理活性のある全長 FGF23 蛋白、およびプロセッシングを受けたフラグメントとして存在している。C 端抗体を用いたウエスタンブロットでは、全長 FGF23 蛋白は 32kDa 近辺に、C 端フラグメントは 16kDa 近辺に検出される(図 2)。プロセッシング部位近傍の ¹⁷⁶Arg, ¹⁷⁹Arg を Gln へ変異させた FGF23 蛋白(以下 RQ 蛋白と記載)は、プロセッシングを受けず、培養液中では、糖鎖の数にしたがって 3 本のバンドとして検出される。この RQ 蛋白の 3 本のバンドをそれぞれ質量分析したところ、FGF23 蛋白は最初に 199~228 番の間、次に 162~175 番の間、最後に 176~187 番の間の Ser または Thr に O 型糖鎖付加を受けると考えられた。

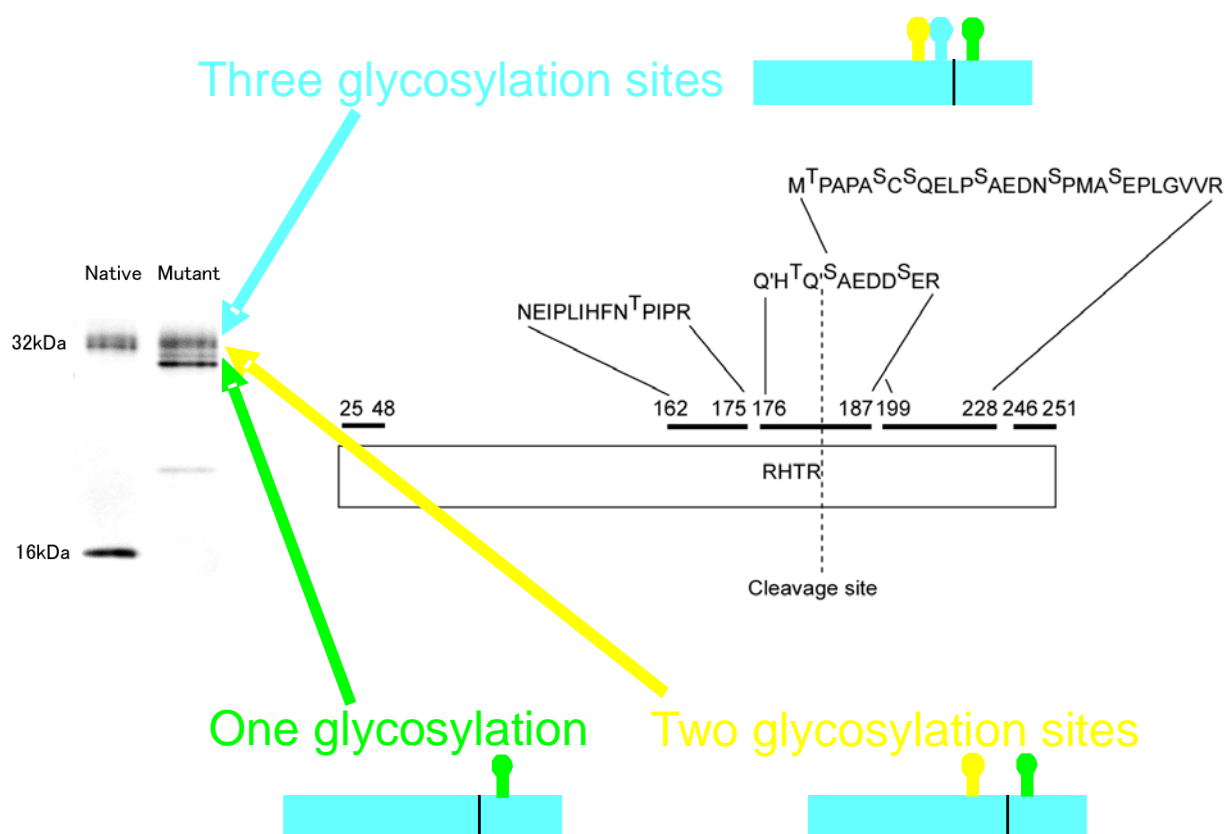


図 2: FGF23 蛋白への O 型糖鎖付加

培養液中の FGF23 蛋白を、FGF23 蛋白 C 端側に対する抗体を用いたウエスタンブロットで検討した。野生型蛋白では、全長蛋白が 32kDa 近辺に、C 端フラグメントが 16kDa 近辺に検出される。RQ 蛋白は、糖鎖の数にしたがって 3 本のバンドとして検出される。FGF23 蛋白は最初に 199~228 番の間、次に 162~175 番の間、最後に 176~187 番の間の Ser または Thr に O 型糖鎖付加を受けると考えられた。

[目的]

FGF23 の糖鎖付加の意義について明らかにするために、以下の検討を行った。

1. FGF23 蛋白への 3 か所の糖鎖付加部位の決定
2. 糖鎖付加異常が FGF23 蛋白のプロセッシングに及ぼす影響
3. 糖鎖付加異常が FGF23 蛋白の活性に及ぼす影響

[方法]

— 糖鎖付加部位を決定 —

RQ 蛋白において、糖鎖付加の可能性のある 10 か所の Ser または Thr を Ala に変異させた蛋白を、ヒト骨芽細胞様細胞株 HOS TE-85 細胞に発現させて、培養上清中の FGF23 蛋白を、¹⁸⁰Ser から ¹⁹⁶Arg の間の配列を認識する C 端抗体(図 3)を用いてウエスタンブロットで解析した。

— 糖鎖付加障害による蛋白発現の変化 —

RQ 蛋白に T171A、T178A、T200A を 2~3 種類導入し、ウエスタンブロットで解析した。

— 糖鎖付加障害によるプロセッシングの変化 —

血清中では、一部の全長 FGF23 蛋白は、セリンプロテアーゼの一種である thrombin により ¹⁹⁶Arg と ¹⁹⁷Ala の間で切断され、²⁵Tyr~¹⁹⁶Arg と ¹⁹⁷Ala~²⁵¹Ile へ分解される(図 3)。Protease inhibitor cocktail(PIC)は、セリンプロテアーゼなどを阻害するプロテアーゼインヒビターである。

野生型 FGF23 蛋白に T171A、T178A、T200A を導入し、ウエスタンブロットで解析した。更に、培養上清には PIC を添加して同様に検討した。

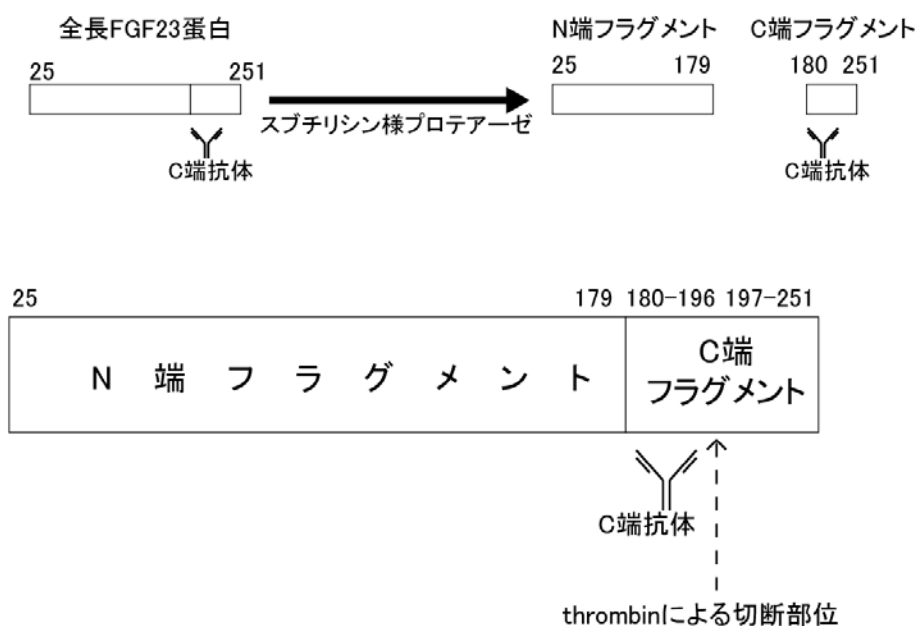


図 3: thrombin による全長 FGF23 蛋白の切断

血清中では、一部の全長 FGF23 蛋白は、thrombin により ¹⁹⁶Arg と ¹⁹⁷Ala の間で切断を受ける。今回のウエスタンブロットで使用した C 端抗体は、¹⁸⁰Ser から ¹⁹⁶Arg の間の配列を認識している。

— 糖鎖付加障害による蛋白活性の変化 —

野生型 FGF23 蛋白、および T200A 変異蛋白を HOS TE-85 細胞の培養上清から採取した。Thrombin の影響を避けるために無血清培地を使用し、PIC を培養上清に添加した。Klotho 蛋白を発現させた HEK293 細胞に FGF23 蛋白を作用させ、egr-1 レポーターアッセイで FGF23 蛋白活性を測定した。

【結果】

— FGF23 蛋白の糖鎖付加部位 —

RQ 蛋白に T171A, T178A, T200A 変異を導入したところ、32kDa 近辺の 3 本のバンドのうち、分子量が最も大きく、3 つの糖鎖を持つと考えられるバンドが消失した(図 4)。RQ 蛋白に T171A, T178A, T200A 変異を 2~3 種類導入したところ、バンドはさらに消失した(図 5)。

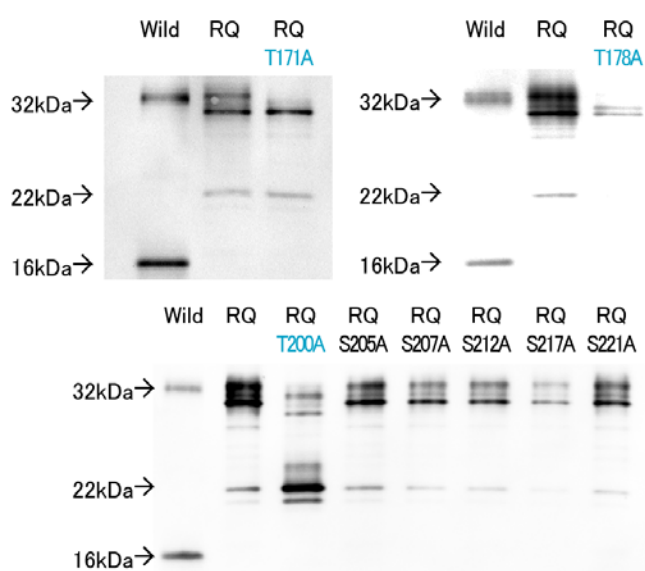


図 4 FGF23 蛋白の糖鎖付加部位

T171A, T178A, T200A では、最も分子量が大きく、3 つの糖鎖を有すると考えられるバンドが消失した。

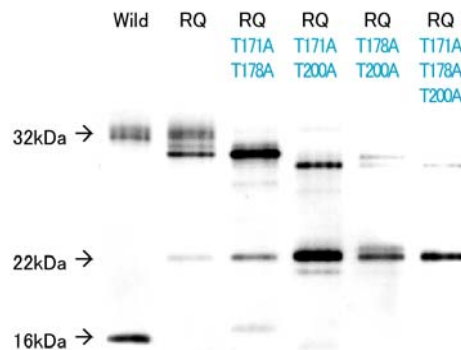


図 5: FGF23 蛋白への糖鎖付加部位 RQ 蛋白に T171A, T178A, T200A 変異を 2~3 種類導入したところ、バンドはさらに消失した。

— 野生型 FGF23 蛋白への変異導入 —

野生型 FGF23 蛋白に T171A, T178A 変異を導入すると、32kDa 近辺の蛋白はほぼすべて消失した(図 6, 7)。一方、T200A では、PIC 添加時は 32kDa 近辺(図 7)、PIC 無添加時は 22kDa 近辺にバンドを認めた(図 6)。

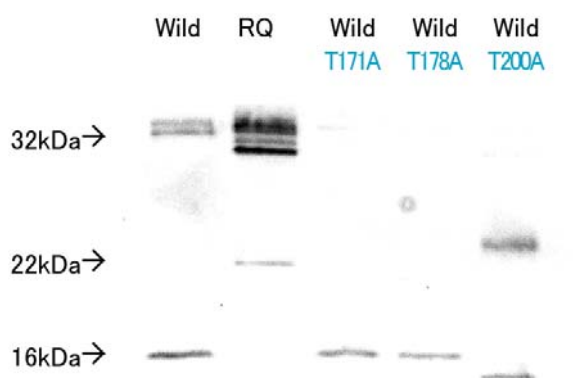


図 6 野生型 FGF23 蛋白への変異導入(PIC 無添加)
野生型 FGF23 蛋白に T171A, T178A 変異を導入すると、全長 FGF23 蛋白は消失した。T200A 変異では、22kDa 近辺のバンドを認めた。

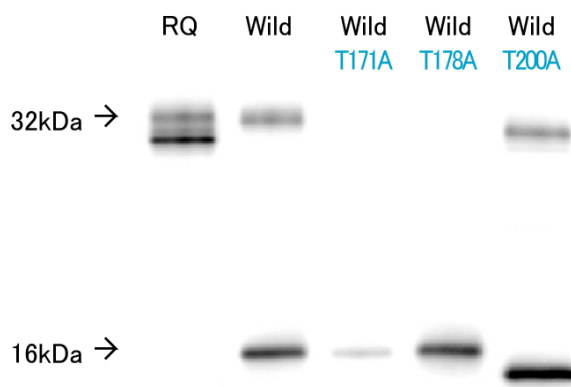


図 7 野生型 FGF23 蛋白への変異導入(PIC 添加)
野生型 FGF23 蛋白に T171A, T178A 変異を導入すると、全長 FGF23 蛋白は消失した。T200A 変異では、32kDa 近辺のバンドを認めた。

— T200A 変異蛋白の機能解析 —

野生型 FGF23 蛋白に T200A 変異を導入しても、FGF23 蛋白活性は変化しなかった。

[考察]

RQ 蛋白に T171A, T178A, T200A 変異を導入した結果から、FGF23 蛋白への糖鎖付加は、最初に ^{200}Thr 、次に ^{171}Thr 、最後に ^{178}Thr に生じると考えられた。

図 4、5 の結果から糖鎖付加のルールを検討した(図 8)。RQ(T171A, T178A)の結果から、 ^{200}Thr の糖化は約 100% 生じ、RQ(T178A, T200A)の結果から、 ^{171}Thr の糖化は約半分で生じると考えられた。RQ(T171A, T200A)の結果から、 ^{178}Thr は単独では糖鎖付加を受けず、RQ(200A)の結果から、 ^{178}Thr の糖化には ^{171}Thr の糖化が必須であると判明した。

野生型 FGF23 蛋白に T171A または T178A 変異を導入すると、プロセッシング亢進を認めた(図 6、7)。RQ 蛋白の結果から、T171A では、 ^{171}Thr だけでなく ^{178}Thr への糖化も障害されていると考えられた。したがって、プロセッシング阻害には ^{178}Thr の糖化が必須と考えられた。一方、T200A 変異では、プロセッシング亢進を認めなかった(図 7)。

また、RQ 蛋白の 3 本のバンドの比率を検討したところ、一番上のバンドは約 46%、中央のバンドは約 9%、一番下のバンドは約 45%であった。

上記の結果から、最初に ^{200}Thr がほぼ 100%糖化され、次に ^{171}Thr が約 55%糖化され、そのうち約 84%が ^{178}Thr にも糖化されることが明らかとなった(図 9)。そして、 ^{178}Thr に糖鎖がない蛋白はプロセッシングを受け、不活性なフラグメントとなることが示された。

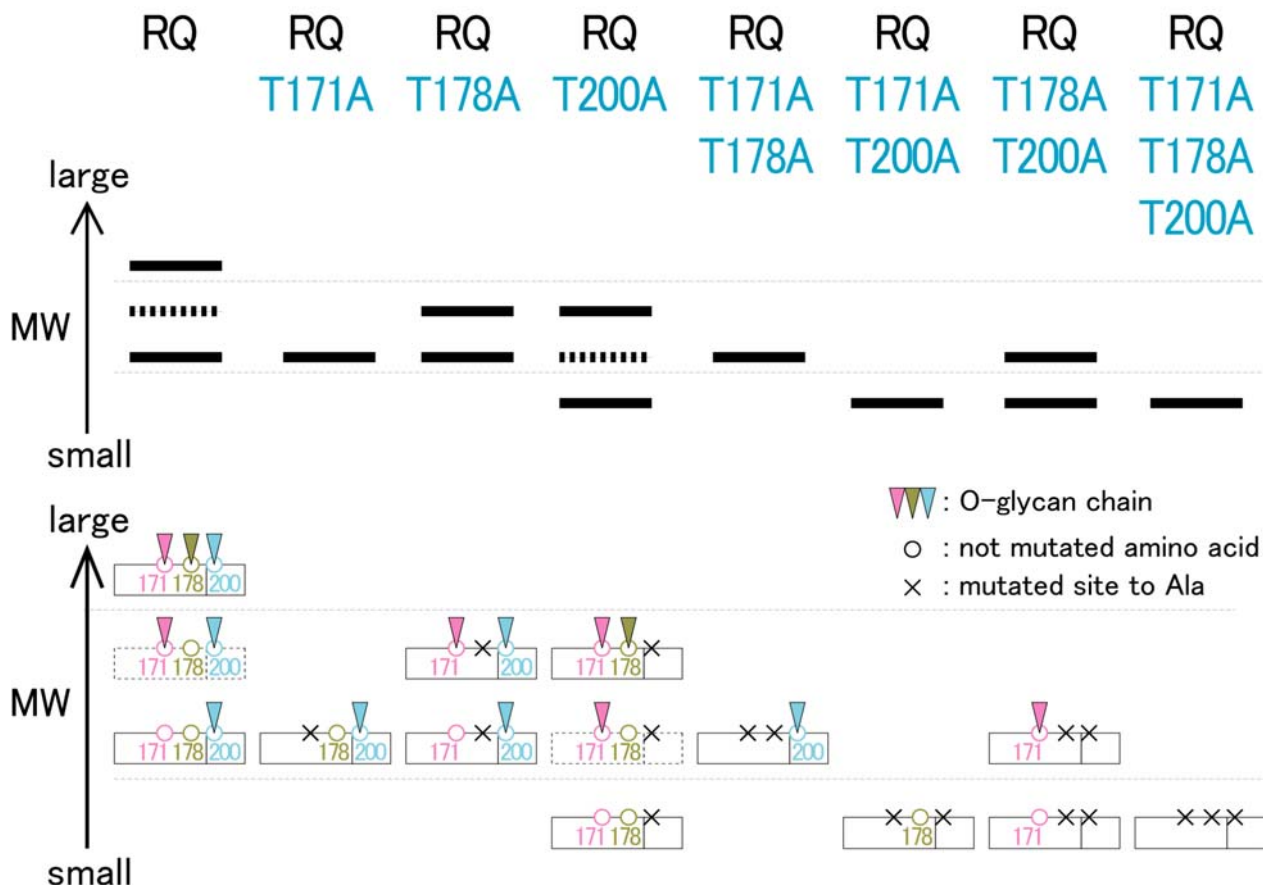


図 8 T171A, T178A, T200A 変異蛋白のバンドパターンのおよめ
 RQ(T171A, T178A)→ ^{200}Thr への糖鎖付加はほぼ 100%起こる。
 RQ(T178A, T200A)→ ^{171}Thr への糖鎖付加は約半分で起こる。
 RQ(T171A, T200A)→ ^{178}Thr は単独では糖鎖付加がおこらない。
 RQ(200A)→ ^{171}Thr が糖化されると、そのうちの多くが ^{178}Thr も糖化される。

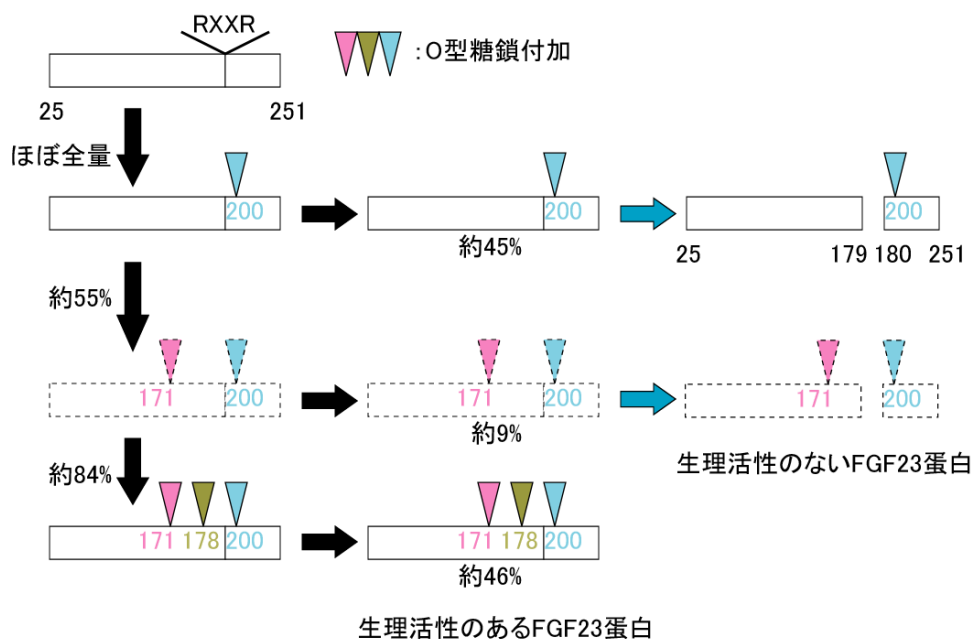


図 9 FGF23 蛋白の糖鎖付加の形式

最初に ^{200}Thr が糖化される。次に約 55%が ^{171}Thr に糖化を受ける。更に約 84%が ^{178}Thr にも糖化を受ける。 ^{178}Thr に糖化を受けた蛋白はプロセッシング抵抗性だが、 ^{178}Thr に糖化を受けなかった蛋白は不活性なフラグメントとなる。

野生型 FGF23 蛋白に T200A 変異を導入したところ、PIC 添加時は 32kDa 近辺(図 7)、PIC 無添加時は 22kDa 近辺に蛋白が検出された(図 6)。過去の検討によると、thrombin による分解産物である $^{25}\text{Thy} \sim ^{196}\text{Arg}$ は約 22kDa である。したがって、T200A 変異は、thrombin による FGF23 蛋白分解を促進することが示唆された。しかし in vivo の血漿中では ^{196}Arg と ^{197}Ala の間で分解された蛋白を認めない。したがって、その生理的意義は不明である。

また、 ^{200}Thr の糖化は FGF23 蛋白の活性に関与しなかった。

【結論】

FGF23 蛋白は ^{171}Thr , ^{178}Thr , ^{200}Thr に糖鎖付加を受けることが明らかとなった。 ^{171}Thr の糖化は ^{178}Thr の糖化に必須であり、 ^{178}Thr の糖化はプロセッシングの阻害に必須であった。 ^{200}Thr の糖化は、プロセッシングや蛋白の活性に影響しなかった。 ^{200}Thr の糖化は、in vitro の血清中では thrombin による全長 FGF23 蛋白分解を抑制するが、その生理的意義は不明である。