

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 鈴木 尚宜

本研究はFGF23蛋白の活性維持に重要な役割を演じていると考えられるムチン型O型糖鎖付加について明らかにするために、ヒト骨芽細胞様細胞株HOS-TE85細胞に変異FGF23蛋白を導入する系を用いて、ウエスタンブロットで解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1.  $^{176}\text{Arg}$ 、 $^{179}\text{Arg}$ をGlnへ変異させたFGF23蛋白(RQ蛋白)を発現するベクターを作成した。RQ蛋白において162~228番目の間に存在する10ヵ所のSerあるいはThrをそれぞれAlaに変異させた蛋白を発現するベクターを作成し、HOS-TE85細胞に導入した。培養上清中のFGF23蛋白を、FGF23蛋白のC端側に対する抗体を用いたウエスタンブロットで解析したところ、糖鎖付加部位は $^{171}\text{Thr}$ 、 $^{178}\text{Thr}$ 、 $^{200}\text{Thr}$ であることが示された。
2. RQ蛋白において、T171A、T178A、T200A変異の2~3種類を導入した蛋白を発現するベクターを作成し、同様にウエスタンブロットで解析した。その結果、 $^{200}\text{Thr}$ への糖鎖付加は約100%生じること、 $^{171}\text{Thr}$ への糖鎖付加は約55%生じること、 $^{178}\text{Thr}$ への糖鎖付加には $^{171}\text{Thr}$ の糖鎖が必須であること、 $^{171}\text{Thr}$ が糖化された蛋白はそのうちの約84%が $^{178}\text{Thr}$ にも糖化されることが示された。
3. 野生型FGF23蛋白においてT171A、T178A、T200A変異を導入した蛋白を発現するベクターを作成した。セリンプロテアーゼを阻害するprotease inhibitor cocktailを添加した条件下で解析したところ、スブチリシン様プロテアーゼによるプロセッシングの阻害には $^{178}\text{Thr}$ への糖鎖付加が必須であることが示された。一方、 $^{200}\text{Thr}$ へのO型糖鎖付加は、スブチリシン様プロテアーゼによるFGF23蛋白プロセッシングには影響しなかった。
4. Alpha-Klothoの発現ベクターを導入したHEK293細胞を用いて、*egr-1*レポーターアッセイを行ったところ、 $^{200}\text{Thr}$ へのO型糖鎖付加は、蛋白活性に関与していないことが示された。
5. Protease inhibitor cocktailを添加しない条件下でのウエスタンブロット解析や全長FGF23アッセイの結果から、 $^{200}\text{Thr}$ への糖鎖付加はthrombinによるFGF23切断を阻害していることが示唆された。

以上、本論文はヒト骨芽細胞様細胞株HOS-TE85細胞に発現させた変異FGF23蛋白の解析から、FGF23蛋白へのO型糖鎖付加の正確な部位や、それぞれの糖鎖付加の意義について検討した。本研究はFGF23蛋白の翻訳後修飾について解明したものであり、学位の授与に値するものと考えられる。