

審査の結果の要旨

高士 祐一

本研究は生体に備わると考えられるリン感知機構と、血中リン濃度調節に中心的な役割を担う線維芽細胞増殖因子 23 (fibroblast growth factor 23; FGF23) の活性調節機構を明らかにするために、*in vivo* および *in vitro* 双方の系を用いて FGF23 の活性調節機構を詳細に検討した上で、*in vitro* の系で細胞外リンの細胞内シグナル伝達経路の解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. マウスを高リン食、コントロール食、低リン食の 3 群に割り付け 2 週間摂取させると、食餌中のリン含有量依存的に血清中の活性を有する全長 Fgf23 濃度の上昇が認められた。この時、大腿骨中の遺伝子の発現を qPCR で評価したところ、低リン食では *Fgf23* そのものの発現とともに、Fgf23 蛋白のプロセッシングを阻害する作用を持つ UDP-N-acetylalpha-D-galactosamine ; polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GalNac-T3) をコードする *UDP-N-acetylalpha-D-galactosamine ; polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GALNT3)* の発現が低下していた。一方、高リン食では *Fgf23* そのものの発現は有意な変化を認めず、*Galnt3* の発現のみが亢進していた。したがって、高リン食負荷に対する血清全長 Fgf23 濃度の上昇は *Galnt3* を介した翻訳後修飾の機構によって主に担われていることが明らかとなった。
2. 骨芽細胞様細胞株である UMR106 細胞を用いて、*in vitro* の系でさらに *GALNT3* の機能について検討している。細胞外リン濃度の上昇により培養液中に分泌される FGF23 蛋白をウエスタンブロッティングにより検討すると、プロセッシングが阻害されていた。この時、細胞外リン濃度依存的に *Galnt3* 発現の亢進が認められた。
3. UMR106 細胞において、*Galnt3* より早期に発現が変動する遺伝子を DNA マイクロアレイの手法を用いて網羅的に解析している。その結果、複数の転写因子が抽出され、siRNA による遺伝子のノックダウン実験により *early growth response 1 (Egr1)* および *ETS variant 5 (Etv5)* が、細胞外リンによる *Galnt3* 遺伝子の誘導に必要な転写因子であることを示した。
4. 続いて、UMR106 細胞を用いて、細胞外リンの細胞内シグナル伝達経路の探索を試みている。前述の *EGR1*、*ETV5* が FGF 受容体 (fibroblast growth factor receptor; FGFR)、細胞外シグナル調節キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase; ERK) の下流

遺伝子であることに基づいて、FGFR-ERK 経路に着目して検討している。細胞外リンはなんらかの機序で Fgfr を活性化し、Fgfr substrate 2 alpha (Frs2 $\alpha$ ) の Tyr196 の選択的なリン酸化を誘導、次いで Erk の一過性のリン酸化を惹起することで核内まで細胞外リンのシグナルを伝達していることを示した。

5. 前述のリンによる Fgfr-Frs2 $\alpha$ -Erk の活性化、*Galnt3* の誘導にⅢ型ナトリウム-リン共輸送体 (type Ⅲ sodium-phosphate cotransporter; type Ⅲ NaPi) を介したリンの細胞内への流入の必要性を type Ⅲ NaPi の阻害剤である phophonofomic acid を用いて示した。

以上、本論文はリン負荷に対する FGF23 の活性調節に *GALNT3* が中心的な役割を担うこと、*GALNT3* までのシグナル伝達経路として、type Ⅲ NaPi-FGFR-FRS2 $\alpha$ -ERK 経路の重要性および初期転写因子としての *EGR1*、*ETV5* の存在を明らかとした。本研究はこれまで未知に等しかった生体のリン感知機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。