

## 研究題目 FGF23 産生を制御する骨特異的リン感知因子の探索

### 研究組織

研究代表者：高士 祐一（福岡大学医学部）

共同研究者：沢津橋 俊、福本 誠二（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：川浪 大治（福岡大学医学部）

### 【1】研究の概要

#### [1-1]本研究の目的・概要

線維芽細胞増殖因子 23(fibroblast growth factor 23: FGF23)は、骨により産生・分泌され、腎臓近位尿細管で作用し、生体のリン代謝に中心的な役割を果たすホルモンである。現在まで、FGF23 の産生・分泌を担う骨が、いかに血中リン濃度の変動を感知し、どのように血中 FGF23 濃度を調節しているのかは未解明の課題である。申請者はこれまでの研究の中で、リン負荷に対する FGF23 産生調節に、O 型糖鎖修飾酵素である *Galnt3* 遺伝子産物が重要な役割を担っていることを突き止めた。さらに骨芽細胞系細胞株 UMR106 を用いて、*Galnt3* 遺伝子を指標として細胞レベルでのリン応答を評価する系を新規に構築した。本細胞を用いたトランスクリプトーム解析から、細胞のリン応答における ERK のリン酸化、および *Galnt3* 遺伝子の誘導に必須の転写因子 EGR1、ETV5 の関与を明らかとした。さらに、リン酸化蛋白のプロテオーム解析から ERK の上流分子として FGF 受容体 1 (FGF receptor 1: FGFR1)を同定するに至った。しかし、ミネラルであるリンがファーストメッセンジャーとしてどのような機構を介して、ユビキタスに発現している受容体型チロシンキナーゼである FGFR1 を活性化するのは不明である。そこで本研究計画では、リンによる FGFR1 活性化のメカニズムの解明、特に直接的な骨特異的リン感知因子を探索・同定することを目的とした。

#### [1-2]研究の方法・経過

前述の UMR106 細胞を用いた *in vitro* の系で、細胞外リン濃度を上昇させた時に FGFR1 への結合が変化する蛋白の中から、直接的骨特異的リン感知因子の同定を試みることにした。こ

で、FGFR1 に対する特異的な抗体があれば、免疫沈降法などの従来法で結合蛋白の探索が可能である。しかし、FGFR1 に関しては特異的な抗体が世界的に見ても全く存在しないという問題がある。そこで、標識 FGFR1 を UMR106 細胞に導入することで本問題の解決を試みるべく、下記の 2 つの手法を用いる研究計画を立案した。

A)GFP-Trap 法:FGFR1 の C 末端(細胞内)に GFP を付加した FGFR1 の安定発現細胞株を得る。本細胞にリン負荷を行い、GFP-Trap 法を用いて、GFP 付加 FGFR1 に結合する蛋白を LC-MS/MS で網羅的に解析する。

B)Bio-ID 法:FGFR1 にビオチンリガーゼを融合させ、リン負荷時に相互作用を示した蛋白をビオチン化する。具体的には、FGFR1 の C 末端に大腸菌由来のビオチンリガーゼである *birA* を付加した FGFR1 の安定発現細胞株を得る。ビオチン化した蛋白をビオチン-アビジン結合により回収し、LC-MS/MS で同定を試みる。

LC-MS/MS 解析後は、TMT(tandem mass tag)法を用いて定量解析し、fold change と p 値から候補因子の優先順位付けを行う。次いで、siRNA により各候補因子をノックダウンし、既に確立しているリン酸化 ERK のレポーターアッセイを用いてスクリーニングを行い、候補因子を絞り込む。

### 【2】研究成果

#### [2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

GFP-trap 法を用いたプロテオーム解析を施行するために、GFP 付加 FGFR1 安定発現 UMR106 細胞の作製に着手した。まず、FGFR1 の C 末端に GFP を付加した FGFR1 のコンストラクトを作製した。本コンストラクトを UMR106 細胞にリポフェクタミンを用いて過剰発現した。しか

し、GFP の蛍光は確認できたものの、FGFR1 の本来の局在である細胞膜には存在せず、細胞質中でアグリゲーションを起こしていた。過剰発現の系では、GFP 付加 FGFR1 蛋白の小胞体ないしゴルジ体から細胞膜への移送に問題が生じているものと考えられた。そこで、GFP 付加 FGFR1 を細胞膜に発現させるために、安定発現細胞株を得ることとした。合計 6 クローン樹立したところ、うち 2 クローンにおいて、GFP の蛍光が細胞膜上に観察された。これらの細胞の細胞外リン濃度を 1 mM から 5 mM まで上昇させたところ、リン応答性の ERK のリン酸化が認められた。したがって、作出した GFP 付加 FGFR1 安定発現 UMR106 細胞に、リン応答性が残存していることが確認された。一方、本細胞のライセートを用いて、GFP のウエスタンブロットによる検出を試みたところ、細胞膜蛋白抽出用の Lysis buffer でわずかに検出されるのみであることが判明した。LC-MS/MS 解析に耐え得る Lysis の条件設定を検討していく必要があることが明らかとなった。

#### [2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究は、カルシウム感知受容体の同定が副甲状腺ホルモンの分泌抑制を惹起する新規薬剤の開発に結び付いたように、同定したリン感知因子を標的とした新規創薬につながることを期待される。これにより、難治性疾患であるくる病・骨軟化症、および本邦に 1,330 万人もの罹患患者がいるとされる慢性疾患である慢性腎臓病に対する新規治療法の開発という臨床応用を目指すものである。また、ミネラルであるリンが、リガンド非依存性に受容体型チロシンキナーゼである FGFR1 を活性化する詳細なメカニズムを解明できれば、細胞生物学的にも大きなインパクトを持ち得るものと考えられる。

### 【3】主な発表論文等

#### [3-1]論文発表

1) Takashi Y, Sawatsubashi S, Endo I, Ohnishi Y, Abe M, Matsuhisa M, Kawanami D, Matsumoto T, Fukumoto S. Skeletal FGFR1 signaling is necessary for regulation of serum phosphate level by FGF23 and normal life span. *Biochem Biophys Res Commun* 27: 101107, 2021.

2) Takashi Y, Kawanami D, Fukumoto S. FGF23 and Hypophosphatemic Rickets/Osteomalacia. *Curr*

*Osteoporos Rep* 19(6): 669-675, 2021.

3) Takashi Y, Kawanami D. The Role of Bone-Derived Hormones in Glucose Metabolism, Diabetic Kidney Disease, and Cardiovascular Disorders. *Int J Mol Sci* 23(4): 2376, 2022.

4) Takashi Y, Fukumoto S. Phosphate-Sensing. *Adv Exp Med Biol* 1362: 27-35, 2022.

#### [3-2]学会発表

1) 高士祐一, 沢津橋俊, 小迫英尊, 大西幸代, 遠藤逸朗, 田邊真紀人, 安倍正博, 松久宗英, 松本俊夫, 福本誠二, 川浪大治. 骨リンセンサー分子 FGFR1 による高リン血症発症防御は生存率を向上させる. 第 71 回日本体質医学会総会, Web 開催, 2021 年 9 月, 2021 年

2) 高士祐一, 大西幸代, 遠藤逸朗, 沢津橋俊, 田邊真紀人, 安倍正博, 川浪大治, 松本俊夫, 福本誠二. 骨の FGFR1 によるリン濃度感知, 高リン血症発症防御は生存率を向上させる. 第 39 回日本骨代謝学会学術集会, Web 開催, 2021 年 10 月, 2021 年

#### [3-3]成果資料等

なし

### 【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

今回の共同研究により、骨特異的リン感知因子を探索するためのツールとして、GFP 付加 FGFR1 安定発現 UMR106 細胞の作出に成功した。今後は、本細胞株において LC-MS/MS 解析に耐え得る Lysis の条件設定を行った上で、GFP-Trap 法を用いたプロテオーム解析を予定している。