

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 トンソン ブーンリット

インスリン様成長因子- I (insulin like growth factor - I : IGF-I) はインスリンファミリーに属する成長因子の一つで、胎盤における糖やアミノ酸輸送など胎仔への栄養輸送を活性化することで胎仔発育に重要な役割を果たしていると考えられているが、その詳細は不明である。本論文は、ラットの胎仔発育ならびに胎盤アミノ酸輸送に及ぼす IGF-I の作用について検討を加えたもので、以下の4章より構成されている。

第1章では、妊娠ラットに合成ヒト IGF-I (1、2、および4 $\mu\text{g/g}$ 体重) を投与し、胎仔重量、胎盤重量、ならびに母体血中、臍帯血中、胎仔血中アミノ酸濃度に及ぼす IGF-I の影響について検討した。母体の体重増加率、摂餌量、胎仔数に IGF-I 投与による影響は認められなかったが、IGF-I を2 $\mu\text{g/g}$ 体重で投与した群では、対照群に比較して胎子重量、胎盤重量に有意な増加が認められた。また、胎子へのアミノ酸取り込みを表す、胎子血中/母体血中アミノ酸濃度比がロイシン、イソロイシン、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンならびにアルギニンで有意に高かった。したがって、IGF-I は胎盤のこれらアミノ酸輸送を増強させることで、胎子発育に影響を及ぼしていると考えられた。

第2章では、IGF-I を投与した妊娠ラットの妊娠21日目の胎盤微絨毛膜小胞を用いてアミノ酸輸送活性(コラーゲンマトリックスの構成アミノ酸であるプロリン、体蛋白構成アミノ酸であるロイシン、エネルギー源となるアミノ酸であるアラニンの取り込み)に及ぼす IGF-I の影響について検討した。微絨毛膜小胞へのアミノ酸取り込みは、検討したいずれのアミノ酸についても Michaelis-Menten kinetics に従う飽和曲線を示した。得られた基質親和性定数 (K_m) ならびに最大取り込み量 (V_{max}) では、IGF-I を1 μg 投与した群のナトリウム依存性のプロリン取り込み、ならびに2 μg 投与群のナトリウム非依存性のアラニン取り込みで K_m 値の増加が、1 μg 投与群のナトリウム依存性プロリン取り込みの V_{max} に有意な増加が認められた。したがって、IGF-I は胎盤のアミノ酸取り込み、とくにプロリンに代表されるアミノ

酸輸送系を増強させると推測された。

第3章では、胎盤に存在すると報告されている各種アミノ酸輸送系のうち、L-システムに着目し、その輸送担体のサブユニットであるLAT1 (L-type amino acid transporter 1)、LAT2 (L-type amino acid transporter 2)、ならびに膜表在性の糖蛋白で、LATのシャペロンである4F2のメッセンジャーRNAの発現量をReverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法で解析した。LAT1ならびに4F2 mRNAの発現量には対照群と差は認められなかったが、LAT2 mRNAの発現量は投与群で有意に高かった。したがって、IGF-Iは少なくとも胎盤微絨毛膜のアミノ酸輸送担体であるLAT2の発現量を増加させ、胎盤のアミノ酸輸送活性を増強させると考えられた。

第4章では、IGF-IによるLAT2の転写調節領域についてChinese hamster ovary細胞(CHO-K1)を用いて検討した。まず、CHO-K1細胞を500 nMのIGF-I存在下で、37℃、5% CO₂の条件で培養したところ、LAT2 mRNAの発現量はIGF-I添加により有意に増加した。ついで、LAT2遺伝子の5'側上流約2 kbの領域を単離し、塩基配列を決定した。この領域について長さの異なる8種の断片を作成し、それらのプロモーター活性をsecretory alkaline phosphatase (SEAP)を用いたレポーターアッセイで検討した。すなわち、CHO-K1細胞に各断片を組み込んだプラスミドを導入し、IGF-I 50ならびに500 nM存在下、37℃で9時間培養した。検討した約2 kbの転写調節領域の内、転写開始部位近傍の88 bpの領域で有意なSEAP活性の増加が認められ、転写開始点を1として-409までの423 bpの領域では有意な抑制が認められた。転写開始部位近傍の88 bpの領域は、その活性は著しく低いものの、IGF-IによるLAT2遺伝子発現調節に関与する可能性があるものと推測された。

以上の結果から、IGF-Iは胎盤のシステム-Lのアミノ酸輸送担体であるLAT2をコードする遺伝子転写を活性化し、LAT2の産生を増加させ、母体のアミノ酸輸送活性を増強させることで、胎仔発育に関連しているものと推測された。

このように本論文は、獣医学上、畜産学上重要な課題である胎仔発育の制御機構の一端を明らかにしたもので、獣医学の学術上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(獣医学)の学位論文として価値あるものと認めた。