

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 11 年度博士課程進学

氏名 井上 義久

指導教官名 加藤 久典

### 論文題目

## アミノ酸による IGFBP-1 遺伝子発現制御機構の解析

近年各種栄養素は様々な遺伝子の発現を制御することが明らかにされ、具体的な作用機構に関しても明確にされている例も多い。しかし、食餌タンパク質やアミノ酸による遺伝子発現制御、特に転写制御機構に関しては、理解が進んでいない。

当研究室では、特に摂食するタンパク質の量および質の変化による生体への影響について様々な解析を行ってきた。成長期のラットでは、食餌中のタンパク質の量および質の低下に伴い著しい成長の遅滞が観察される。現在、この現象はインスリン様成長因子 I (Insulin-like Growth Factor; IGF-I) と呼ばれるホルモンの活性変化によるところが大きいと考えられている。血中には6種の IGF 結合タンパク質 (IGFBPs) が存在し、IGF-I の活性はこれら IGFBPs との結合状態により制御される。特に IGFBPs の中でも IGFBP-1 は、食餌中タンパク質の量および質の低下に伴い主要産生臓器である肝臓での mRNA 量が増加し、それに伴って血中濃度が著しく増加する。IGFBP-1 は IGF-I と結合することで IGF-I 活性を抑制することから、タンパク質による成長の変化に IGFBP-1 が重要な役割を担っていると考えられている。

培養細胞を用いた解析などから、タンパク質含量の低い食事の摂取による IGFBP-1 遺伝子の発現誘導は、血中アミノ酸濃度の変化により転写段階において誘導されることが明らかになった。しかし、この血中アミノ酸濃度の変化が肝臓においてどのように認識され、

またどのような機構によって転写が誘導されるかは全く明らかになっていない。そこで、本研究では、ヒト肝ガン細胞 HepG2 を用いて、アミノ酸による IGFBP-1 遺伝子の発現制御機構を解析した。

## 第1章 アミノ酸による IGFBP-1 遺伝子発現制御機構のシグナル伝達阻害剤を用いた解析

当研究室では、ラット IGFBP-1 遺伝子のプロモーター領域中にアミノ酸応答配列 (Amino Acid Response Unit; AARU) を見出している。この配列には IRE (Insulin Response Element) 並びに HNF-3 結合配列、USF 結合 E-box 様配列が一部重なるように存在している。特に IRE 配列はラット、マウス、ヒトの IGFBP-1 プロモーター中で高度に保存されており、アミノ酸応答に関しても重要であることが示唆された。インスリンによる IRE を介した IGFBP-1 遺伝子の転写制御に関しては、PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase) 並びに mTOR (mammalian Target of Rapamycin) が関与する事が明らかになっている。特に mTOR はアミノ酸による 4E-BP1 並びに S6K1、2 のリン酸化制御に関わる因子であり、IGFBP-1 遺伝子の転写においてもこの経路が関与している可能性が高い。そこで、アミノ酸、特にロイシンによる IGFBP-1 遺伝子発現制御機構とインスリンによるシグナルカスケードとの関連を、PI3K 阻害剤であるワートマニン、mTOR の阻害剤であるラパマイシンを用いて検討した。この結果、ラパマイシン単独では IGFBP-1 mRNA 量は変化しないが、ワートマニンと同時に添加すると、ロイシン欠乏時と同程度まで mRNA 量を増加させた。ロイシン欠乏培地で培養した細胞にロイシンを再添加するとおよそ 4 時間で mRNA 量が完全培地で培養した場合と同程度まで減少した。このロイシンの作用はワートマニンおよびラパマイシンにより部分的に阻害され (それぞれおよそ 50% の阻害効果)、両方の添加による相加効果で完全に阻害されることが明らかになった。このことから、アミノ酸による IGFBP-1 遺伝子の発現制御機構に PI3K 並びに mTOR がそれぞれ異なるシグナル経路を介して関与していることが示唆された。

## 第2章 ロイシン構造類似化合物を用いたロイシン認識機構の解析

アミノ酸 (ロイシン) による IGFBP-1 遺伝子の発現制御に PI3K と mTOR といったシグナル伝達因子が関与することが示されたことで、シグナルの起点となるロイシンの認識機構について調べた。まず、ロイシンの初期代謝産物である  $\alpha$  ケトイソカプロン酸 ( $\alpha$  KIC) により発現が制御されるかを検討した。ロイシンを  $\alpha$  KIC に代謝する分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素 (BCAT) は可逆酵素であるため、細胞内では容易に  $\alpha$  KIC からロイシンへの変換が起こる。そのためアミノ基転移反応の阻害剤であるアミノオキシ酢酸 (AOAA) も同時に添加した。その結果、 $\alpha$  KIC を添加した細胞では IGFBP-1 mRNA 量はロイシン

添加群と同程度と低く、この作用は AOAA を添加しても阻害されなかった。このことから、IGFBP-1 遺伝子の発現制御に関しては  $\alpha$ KIC もロイシンと同様に認識されることが示された。ロイシン欠乏によりオートファジーが誘導されることが知られているが、Miotto らは、合成ペプチドであるロイシル MAP (Multiple Antigen Peptide) は細胞内に取り込まれることなくオートファジーの誘導を阻害することを示した。これは、オートファジー制御に関しては細胞膜上でロイシンを認識していることを示唆している。そこで、ロイシル MAP を合成し、これによる IGFBP-1 mRNA 量の変化を調べた結果、ロイシル MAP を添加した細胞では mRNA 量がロイシンを添加した細胞と同程度まで減少していた。しかし、ロイシンアミノペプチダーゼの阻害剤であるベスタチン処理をすると、ロイシル MAP の分解が抑制されると共に、IGFBP-1 mRNA 量も増加した。このことは、ロイシル MAP 自体に IGFBP-1 遺伝子の発現を制御する作用がないことが示している。以上より、IGFBP-1 遺伝子の発現とオートファジーでは、ロイシンの認識という点に関しては異なった制御を受けていると考えられる。

### 第3章 アミノ酸による IGFBP-1 遺伝子の転写制御と転写後制御機構の検討

ロイシン欠乏による IGFBP-1 mRNA 量の増加は転写レベルで誘導されていることが示唆されている。そこで、HepG2 細胞における PI3K や mTOR の作用機構や、ロイシンと  $\alpha$ KIC の認識機構をより詳細に解析するために、ラット IGFBP-1 遺伝子プロモーターを用いたレポーターアッセイ系の構築を試みた。使用したプロモーター配列は、竹中らが AARU を同定した際に用いた領域と同じものを用いた。しかし、HepG2 細胞ではロイシン欠乏によるプロモーター活性の上昇は、非常に弱かった。他の肝ガン細胞由来の細胞株を用いた検討や、様々なトランスフェクト法を検討した場合、さらにはヒトおよびマウスの IGFBP-1 遺伝子プロモーターを使用した場合も、ロイシン欠乏によるプロモーター活性の上昇は観察されないか、もしくは観察されてもその程度は低く、これだけでは mRNA 量の増加を説明できなかった。ロイシン欠乏による誘導を行わない状態でもプロモーター活性が高いことから、一過性に導入したプロモーターではアミノ酸によるプロモーター活性の抑制が効いていない可能性が高い。肝細胞における stable transfection 系、IGFBP-1 遺伝子を含む長大な DNA 断片の検討などが必要であると考えられた。一方、竹中の結果においても、ロイシンによる IGFBP-1 mRNA 量の変動の程度がプロモーター活性の変化だけでは説明できなかったことから、IGFBP-1 mRNA の安定性についても検討を行った。HepG2 細胞での IGFBP-1 mRNA の半減期はおよそ 12 時間であることが知られているが、ロイシンの再添加などによる mRNA 量の減少は非常に早い。そこで、ロイシンの有無によって IGFBP-1 mRNA の安定性が制御されていないかを検討したところ、ロイシン欠乏により、安定性が

著しく高くなり、ロイシンの再添加により一時的に安定性が低くなることが明らかになった。血中での IGFBP-1 の半減期は短いことが知られているが、mRNA のレベルでも、ロイシンの再添加により速やかに分解する機構が存在することが新たに明らかになった。

#### 第4章 アミノ酸による IGFBP-1 遺伝子発現制御における核外輸送系の関与

IGFBP-1 プロモーター中の IRE に結合する転写因子として FoxO サブファミリーに含まれる FKHR、FKHR-L1、AFX が同定されている。FKHRs はインスリン刺激によりリン酸化されると核外に移行すること、さらにこのリン酸化がラパマイシンによって阻害されることが報告されている。絶食の応答に関しては、当研究室においてラット肝臓の FKHRs が核に移行するという結果を得ている。そこで、アミノ酸による IGFBP-1 遺伝子の発現制御に、核内外の局在が変化する因子が関与していないか、核外移行因子 CRM-1 の阻害剤であるレプトマイシン B (LMB) を用いて検討した。この結果、LMB は、第 1 章で観察されたラパマイシンと同じ作用を示した。さらに、ラパマイシンもしくはワートマニンと同時に添加することによる相加効果についても検討したが、ここでもラパマイシンと同じ作用を示し、ラパマイシンと LMB を同時に添加しても相加効果は全く見られなかった。従って、アミノ酸による IGFBP-1 遺伝子発現制御機構において、mTOR は何らかの因子の核移行の制御を担っていることが示唆された。しかし、FKHR の細胞内局在がアミノ酸によって制御されるかどうかは明らかに出来なかった。アミノ酸によって直接細胞内局在が制御される因子は FKHR を含めて今のところ知られていないため、この因子の同定が待たれるところである。

**総括** アミノ酸による IGFBP-1 遺伝子の発現制御に PI3K 並びに mTOR がそれぞれ別個に関与することが示唆された。また、mTOR は何らかの因子の核内外の移行を制御することで IGFBP-1 遺伝子の発現制御に関与していると考えられた。ロイシンの認識機構においては、ロイシン以外に  $\alpha$ KIC も認識することが明らかになった。さらに、ロイシル MAP では IGFBP-1 mRNA 量を低下させることができなかったことから、この認識機構は、オートファジー制御に関与する機構とは異なると考えられた。今後は、ロイシンの認識分子の同定並びに、認識分子と PI3K や mTOR をつなぐ伝達因子の分析を行うためのアッセイ系の構築が急務であるが、本実験により得られた知見をもとに、より詳細なアミノ酸によるシグナル伝達経路が解明されることが期待される。