

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 井上義久

インスリン様成長因子結合タンパク質-1(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。この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示唆されている。しかし、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。本研究は、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、その結果を四章にまとめたものである。

第一章では、IGFBP-1 遺伝子の発現制御に、アミノ酸、特にロイシンがシグナル因子として機能しているかをシグナル伝達因子の阻害剤を用いて検討を行った。この結果、mTOR の阻害剤であるラパマイシンがワートマニン存在下でのみ IGFBP-1 mRNA 量を増加させること、このラパマイシンの作用はロイシン欠乏時には観察されないことが明らかになった。また、ロイシンが欠乏した細胞へロイシンを投与すると、短時間で IGFBP-1 mRNA が減少するが、ラパマイシンとワートマニンはそれぞれ単独でこのロイシンの作用を部分的に阻害し、相加作用により完全に阻害することも示され、ロイシンによる IGFBP-1 遺伝子発現の制御機構に 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明らかとなった。

第二章では、シグナルの起点となるロイシンの認識機構を解析するために、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) や合成ペプチドであるロイシル MAP (Multiple Antigen Peptide) が IGFBP-1 遺伝子発現へおよぼす影響を調べた。この結果、ロイシル MAP 自身は、IGFBP-1 遺伝子発現に影響は及ぼさないものの、ペプチダーゼの作用により分解されて生じるロイシンによって発現が抑制されること、ロイシンだけでなく  $\alpha$  KIC によっても IGFBP-1 遺伝子発現が抑制されることが明らかになった。これらのことから、ロイシンが細胞内で認識されること、この認識因子はロイシンだけでなく  $\alpha$  KIC も認識できる可能性があることが示された。

第三章では、前章までに得られた知見をより詳細に解析するために IGFBP-1 遺伝子のプロモーター配列を用いたレポーターアッセイ系の構築を試みたが、ロイシンによるプロモーター活性の変化は観察されず、肝細胞における安定遺伝子導入系、IGFBP-1 遺伝子を含む長大なゲノム DNA 断片を用いた検討が必要であると考えられた。一方で、ロイシン欠乏により IGFBP-1 mRNA の安定性が著しく増加すること、ロイシンの投与により、一時的に安定性が大きく低下することを新たに明らかにした。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示唆された。

第四章では、ロイシンによる IGFBP-1 遺伝子発現制御機構に核外移行制御が関与することを、核移行を担う因子 CRM1 の特異的阻害剤であるレプトマイシン B を用いて示した。また、ラバマイシンとの相加作用がないことから、この核外移行制御が mTOR によって制御されていることが明らかになった。

以上、本論文は、アミノ酸、特にロイシンによる IGFBP-1 遺伝子発現制御機構を様々な観点から解析し、この IGFBP-1 遺伝子の発現制御機構に関わる因子および機構の存在を明らかにしたものである。アミノ酸の生理機能については、その作用機構が未だ明らかになっていないことが多く、本論文によって得られた知見は、それら作用機構を解明するに当たって大いに資するものがあり、学術上応用上貢献することが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。