

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 中原 真裕子

肝臓でコレステロールから合成された胆汁酸は、消化管に分泌され、食事中の脂溶性成分を可溶化し消化吸收を補助し、大部分は下部小腸で再吸収され門脈を経て肝臓に戻り、一部分は体外に排出される。コレステロール代謝において胆汁酸は、コレステロール吸収の補助と、胆汁酸への異化を介した体外排出経路という 2 つの役割を果たすことが知られてきたが、近年、胆汁酸なかでもケノデオキシコール酸 (CDCA) は、核内受容体 FXR (Farnesoid X receptor) の内因性リガンドであることが報告され、胆汁酸が遺伝子発現を調節する分子として働き、胆汁酸代謝、及びコレステロール代謝を制御する機能をもつことが明らかになってきた。本研究では胆汁酸によるコレステロール・胆汁酸代謝制御機構の一端を解明することを目的に、FXR の標的遺伝子である小腸胆汁酸結合蛋白 I-BABP (intestinal bile acid-binding protein) の機能に関する解析と、胆汁酸による LDL 受容体発現上昇機構の解析を行なった。

第一章序論では、胆汁酸・コレステロール代謝機構に関する知見と、それを調節する核内受容体、転写因子に関する近年の研究について概説している。

第二章では、胆汁酸による遺伝子調節における、I-BABP の作用の解析を行った。I-BABP は、下部小腸に特異的に発現する約 15 kDa の細胞内可溶性蛋白で、胆汁酸を結合する。小腸細胞内において胆汁酸により FXR を介して I-BABP が誘導された場合、FXR 同様に胆汁酸を結合する I-BABP は、FXR の転写活性に対して何らかの影響を及ぼすことが考えられた。一つには、FXR が I-BABP によりリガンドを奪われる形となり、FXR の転写活性が低下する可能性、もう一つには、逆に I-BABP が FXR に効率的に胆汁酸を受け渡すなどの作用により、転写活性が上昇する可能性があり、これについて検討した。

I-BABP プロモーターを用いた FXR の転写活性検出ルシフェラーゼアッセイ系に I-BABP 発現ベクターを加え、I-BABP による FXR の転写活性の変化を調べたところ、有意な差ではないものの I-BABP 発現により若干転写活性の上昇が認められた。また、GAL4/UAS 系を用いたルシフェラーゼアッセイにより転写活性を調べたところ、こちらでは I-BABP 発現により FXR の転写活性が明らかに亢進した。さらに、I-BABP 発現細胞株を作成し、この二つのルシフェラーゼアッセイを行ったところ、どちらの系においても I-BABP 発現細胞において CDCA による FXR の転写活性の上昇率が、野生株よりも多かった。これらの結果から、I-BABP が FXR の転写活性に対して促進的に働くことが明らかにされた。

第三章では、胆汁酸により LDL 受容体の発現が上昇するメカニズムについて解析を行った。LDL 受容体は細胞内コレステロール量が枯渇すると転写因子 SREBP の活性化により転写が亢進する。ヒト肝臓由来 HepG2 細胞に CDCA 処理をし、LDL 受容体の発現が上昇する条件で、核内の SREBP 量を調べたが、変化はみられなかった。また、LDL 受容体プロモーター上に FXR の結合配列様の配列が存在したため、LDL 受容体が FXR の応答遺伝

子である可能性を検討したが、ルシフェラーゼアッセイ及び FXR の合成リガンドを用いた検討により、FXR の関与は否定された。一方、胆汁酸は細胞内シグナル伝達経路のいくつかを活性化させるという報告があることから、細胞内シグナル伝達経路の関与を各種阻害剤により検討した。PI3Kinase 阻害剤では効果が認められなかつたが、MEK 阻害剤の U0126 及び PD98059 により胆汁酸による LDL 受容体遺伝子の発現上昇が阻害され、MAP キナーゼ経路を介した機構によることが明らかにされた。RNA 合成阻害剤アクチノマイシン D を用いた検討では、胆汁酸処理により LDL 受容体 mRNA が安定化されることが示され、この安定化は MEK 阻害剤により消失した。これらの結果から、胆汁酸が MAP キナーゼ経路を介した LDL 受容体 mRNA の安定化という新たな機構で LDL 受容体の発現を上昇させることが明らかになった。

以上本論文は、I-BABP が FXR の転写活性を促進させること、及び、胆汁酸による LDL 受容体発現上昇の新たなメカニズムを明らかにしており、学術上、応用上貢献するが少なくない。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。