

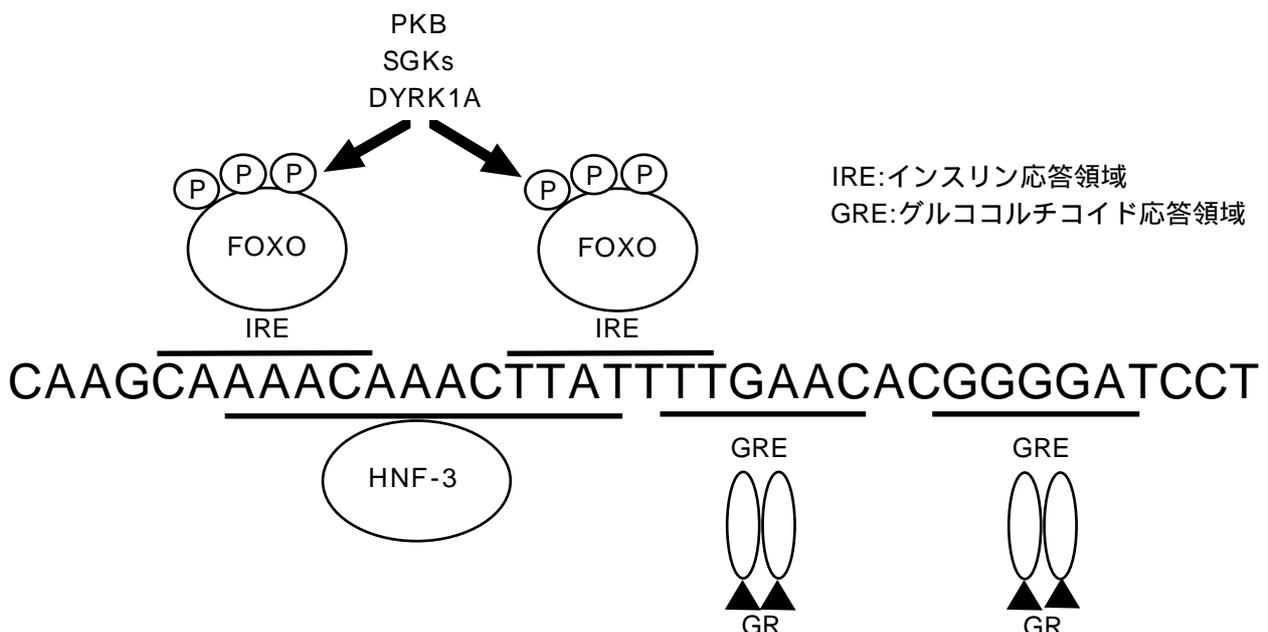
## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成13年度博士課程進学  
氏名 井前正人  
指導教官名 高橋直樹

### 論文題目

## アミノ酸およびホルモンによる遺伝子発現制御に関する転写因子の研究

IGFBP-1は主に肝臓で産生されるタンパク質で、IGF-1を介した動物の成長を制御する重要な因子である。IGFBP-1はアミノ酸欠乏やホルモンに対して、主にその遺伝子の転写を変化させることにより活性を調節している。本研究ではアミノ酸欠乏、インスリン、グルココルチコイドによるIGFBP-1遺伝子転写制御機構の解明を目的とした。当研究室で行われたIGFBP-1遺伝子プロモーターの解析により5'上流領域-77~-112の領域がアミノ酸欠乏への応答に必須なことが明らかとなり、この領域はアミノ酸欠乏応答ユニット(AARU: Amino acid deficiency response unit)と命名された。AARU内部にインスリン応答領域(IRE)とグルココルチコイド応答領域(GRE)が2つずつ存在し、これらが相互作用していることが示唆されている。IREには転写因子FoxOが結合し、GREには glucocorticoid receptor(GR)が結合する。また2つのIREを覆うように転写因子HNF-3が結合する。FoxOおよびHNF-3はforkhead domainと呼ばれるDNA結合領域を有し、forkheadファミリーに分類されている。FoxOにはFoxO1、FoxO3およびFoxO4の3種類のisoformが存在し、HNF-3にもHNF-3、HNF-3およびHNF-3の3種類が存在する。AARUの構造およびそこに作用する転写因子群の概要図を下に記載した。以前の研究において、私はタンパク質栄養条件やホルモンに応答して各HNF-3のmRNA量や核内存在量、IGFBP-1プロモーターへの結合量が増加することを明らかにしている。



FoxOはProtein kinase B (PKB)やSerum- and glucocorticoid-induced kinase (SGK)、Dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase 1A (DYRK1A)などが活性化されると、それらによって核内でリン酸化され、核外へ排出される。またHNF-3やFoxOはグルココルチコイドにより活性化されたGRの活性を調節することがわかっている。現在これら転写因子がアミノ酸欠乏のシグナルを受けているという報告は無く、またインスリンやグルココルチコイドに対する応答に関しても十分な知見は得られていない。そこで第1章ではアミノ酸欠乏、第2章ではインスリン、第3章ではデキサメタゾン(以下DEXと略す)に対する上記転写因子の応答を検討した。またFoxOリン酸化酵素であるPKBやSGK、DYRK1Aも核移行を介したFoxOの活性を制御する重要な因子であるので各章で同様に検討した。第4章では第1章で得られた結果を元に、アミノ酸による遺伝子発現制御機構をシグナル伝達経路など様々な視点から検討した。第5章では第1章で得られた結果を元に、インスリンによる遺伝子発現制御機構を検討した。

## 第1章 アミノ酸欠乏によるIGFBP-1遺伝子およびその発現制御に関する因子の解析

始めにin vivoでのアミノ酸欠乏によるIGFBP-1遺伝子の転写促進機構を解析するため、当研究室で以前から行われている方法で血中アミノ酸濃度を变化させた。すなわち5週齢のWistar系雄ラットを予備飼育後、3群に分けカゼイン食、グルテン食または無タンパク質食を7日間制限給餌し、8日目の給餌開始後1.5時間目に解剖、肝臓を摘出した。まず肝臓より核タンパク質を抽出し、各転写因子の核内存在量を測定したところ、3種のHNF-3およびFoxO4が無タンパク質食給餌により増加していた。また肝臓全抽出液(homogenate)中の存在量も測定したところ、HNF-3 およびFoxO4が無タンパク質食給餌により増加していた。HNF-3 およびFoxO4に関しては全抽出液に対して核内に存在する比率がタンパク質栄養条件の悪化により増加していることから核移行段階での制御が起こっていると考えられる。またHNF-3 に関しては核タンパク質抽出液を用いた場合の増加率のほうが肝臓全抽出液を用いた場合より大きいことから、翻訳以前の段階および核移行段階の制御を受けることにより核内存在量が増加していると考えられる。次にFoxOリン酸化酵素についても検討したところ、phospho-PKBの核内存在量が無タンパク質食給餌により減少していた。SGKおよびDYRK1Aに関してはウエスタンブロットでは検出出来なかったがmRNA量を測定したところ、SGK-1のmRNA量がタンパク質栄養条件の悪化により減少することが明らかとなった。これによりFoxOリン酸化酵素の活性が低下することによりFoxO4が核内に貯蔵されていくことが示唆された。一方、各転写因子のmRNA量の変化も調べたところ、HNF-3 およびFoxO4のmRNA量が無タンパク質摂食により増加していた。これによりHNF-3 およびFoxO4が全抽出液で増加していた要因はmRNA量の増加によることがわかった。

これらin vivoで得られた現象をより詳細に解析するため、培地中アミノ酸を除去する(以後AA-と略す)ことによりin vivoの条件を細胞培養系で再現することを試みた。AA-培地において肝ガン細胞であるH4IIEおよびHepG2両方でIGFBP-1mRNA量の増加を再現することが出来た。しかしアミノ酸1種類を単欠乏させた培地においてはHepG2細胞において必須アミノ酸単欠乏時にmRNA量が増加したのに対し、H4IIE細胞ではグルタミン欠乏時に顕著に増加し、必須アミノ酸単欠乏時には微増に留まったことから、両細胞において各アミノ酸欠乏に対する応答が異なることが示された。またin vivoでmRNA量を測定したIGFBP-1以外の遺伝子に関して両細胞で同様に測定したところ、H4IIE細胞において

FoxO1およびSGK-1のmRNA量が減少し、HepG2細胞においてFoxO1、SGK-1mRNA量が増加し、SGK-2が減少することが明らかになった。FoxO1およびSGK-1遺伝子に関して両細胞でAA-に対する応答が逆転していることから両細胞のAA-に対する応答が異なることが示された。

## 第2章 インスリンによるIGFBP-1遺伝子およびその発現制御に関する因子の解析

in vivoでのインスリンによる効果を解析するために本章ではストレプトゾトシン(以下STZと略す)投与による糖尿病発症あるいは48時間の絶食によってインスリン低下状態を作り出し、第1章と同様の解析を行った。STZ投与によりHNF-3、HNF-3、FoxO1、FoxO4の核内存在量が増加し、phospho-PKBが減少した。しかしFoxO1およびFoxO4に関しては実験期間中無タンパク質食を摂取させた場合には核内存在量が減少していた。mRNA量に関してはHNF-3、HNF-3、FoxO4およびSGK-2が増加し、FoxO1、FoxO3およびDYRK1Aが減少した。一方絶食によってHNF-3、HNF-3、HNF-3およびphospho-PKBの核内存在量が減少し、FoxO1およびFoxO4が増加した。絶食後の3時間の再給餌によりHNF-3、FoxO1、FoxO4およびphospho-PKBがコントロール群と同レベルまで回復した。HNF-3およびFoxO1に関しては再給餌時間を増やせば回復する可能性がある。またmRNA量はHNF-3、SGK-1およびSGK-2が減少し、HNF-3、HNF-3、FoxO1、FoxO3、FoxO4、DYRK1Aが増加した。続いてin vitroでの応答も調べたところ、インスリン添加によりH4IIE細胞ではIGFBP-1、FoxO4およびSGK-1のmRNA量が減少し、HepG2細胞ではIGFBP-1、SGK-1のmRNA量が減少した。これまでFoxOによる遺伝子発現制御機構は核移行による制御にのみ焦点が当てられていたが、H4IIE細胞ではmRNA量の変化による制御も存在することが明らかとなった。

## 第3章 グルココルチコイドによるIGFBP-1およびその発現制御に関する因子の解析

カゼイン食あるいは無タンパク質食を給餌したラットに毎日DEXを投与し、第1章および第2章と同様の解析を行った。DEX投与によりHNF-3、HNF-3の核内存在量が増加し、FoxO1およびphospho-PKBが減少した。またmRNA量に関してはDEX投与によりHNF-3、HNF-3、FoxO1、FoxO3が増加し、SGK-1、SGK-2およびDYRK1Aが減少した。また無タンパク質食を給餌した際のHNF-3のmRNA量およびタンパク質量の増加はDEX投与により打ち消され、コントロール群のレベルまで回復した。細胞系に関しては、H4IIE細胞ではIGFBP-1とFoxO1、SGK-1のmRNA量がDEX添加により増加しDYRK1AのmRNA量が減少した。HepG2細胞ではIGFBP-1、HNF-3、SGK-1のmRNA量が増加した。SGKは細胞系においてDEX添加によりmRNA量が激増するキナーゼとして同定されたものだが、in vivoではDEX投与により減少することが明らかとなった。

## 第4章 肝細胞におけるアミノ酸による遺伝子発現制御機構の解析

第1章でH4IIE細胞においてIGFBP-1、FoxO1およびSGK-1のmRNA量、およびHepG2細胞においてIGFBP-1、FoxO1、SGK-1およびSGK-2のmRNA量がアミノ酸欠乏に反応して変化することを明らかにした。そこで両細胞において数種のインスリンシグナル伝達物質(PI3K、mTOR、ERK、JNK、p38MAPK)、Protein kinase A(PKA)およびProtein kinase C(PKC)の阻害剤、cAMP-dependent protein kinase (AMPK)の活性

化剤を用いて、アミノ酸欠乏の効果が消失するかを検討した。H4IIE細胞においてIGFBP-1のmRNA量の増加はPI3K、JNK、ERKおよびPKA阻害剤、FoxO1のmRNA量の減少はPI3K、JNK、ERKおよびPKA阻害剤、そしてSGK-1のmRNA量の減少はPI3K、JNK、p38MAPK、ERKおよびPKA阻害剤によって消失した。またHepG2細胞におけるIGFBP-1 mRNA量の増加はJNK、p38MAPK、ERKおよびPKA阻害剤、FoxO1の増加はPI3K、JNKおよびPKA阻害剤、SGK-1の増加はPI3K、p38MAPK、ERKおよびPKA阻害剤、そしてSGK-2の減少はPI3K、p38MAPK、ERKおよびPKA阻害剤によって消失した。そこで両細胞で阻害剤の効果が認められたp38MAPK、JNK、ERKおよびCREB(PKAの活性を反映していると思われる)のリン酸化量を細胞および第1章で摘出した肝臓を用いて測定した。無タンパク質食摂取群においてphospho-JNKおよびphospho-CREBは減少し、phospho-p38MAPKおよびphospho-ERKは増加した。また細胞系では両細胞共にphospho-JNK、phospho-ERKおよびphospho-CREBは減少していた。しかし動物とは異なり細胞系ではphospho-p38MAPKに変化は見られなかった。

## 第5章 肝細胞におけるインスリンによる遺伝子発現制御機構の解析

第2章でH4IIE細胞においてIGFBP-1およびFoxO4のmRNA量、およびHepG2細胞においてIGFBP-1およびSGK-1のmRNA量がインスリン添加に应答して変化することを明らかにした。そこで第4章と同じ阻害剤を用いてインスリンの効果が消失するかを検討した。H4IIE細胞におけるIGFBP-1 mRNA量の減少はmTORの阻害剤およびAMPK活性化剤、またFoxO4のmRNA量の減少はPI3KおよびmTORの阻害剤により消失した。HepG2細胞におけるIGFBP-1およびSGK-1 mRNA量の減少はPI3Kの阻害剤の添加により消失した。

## 総括

ラット肝臓においてアミノ酸欠乏やホルモン刺激に対して、AARU内に結合する因子のmRNA量やFoxOキナーゼの活性が変化し、その結果核内存在量が変化することによりIGFBP-1遺伝子の転写を制御していることが示唆された。一方細胞系ではラット肝臓と全く異なるmRNA量の変化を示し、IGFBP-1遺伝子発現制御機構が*in vivo*および*in vitro*で異なっていることがわかった。*in vivo*での結果を*in vitro*で完全に再現できなかったが、細胞種によりアミノ酸欠乏やホルモンに対する応答機構が異なることが示され、細胞のコンテキストに依存した制御が関与していると考えられた。しかしアミノ酸欠乏による遺伝子発現制御にJNK、ERKおよびPKAが関与していることが*in vitro*で明らかとなり、実際ラット肝臓においてもこれらシグナル因子の活性が変化していることから、*in vivo*においてもこの経路を介した制御を受けていることが示唆された。またIGFBP-1遺伝子のインスリンによる制御に関しても、以前より報告のあるFoxOのリン酸化による核移行制御に加え、FoxO4のmRNA量が減少することを今回初めて明らかにした。今後はこれら転写因子がIGFBP-1の遺伝子発現制御機構にどのように関与するかを遺伝子抑制等の手法で解明されることが望まれる。また今回遺伝子発現に変化のあった遺伝子に関してもそれらのプロモーター構造を解析することにより、アミノ酸やホルモンに対する、初期段階の応答因子が解明されることが期待される。