

## 審査結果の要旨

氏名 榊原 伊織

## 審査の結果の要旨

本論文においてアセチル-CoA 合成酵素(II 型) (AceCS2) 遺伝子の欠損マウスの作成によってこの酵素の個体における役割を解析した。AceCS2は骨格筋に主に発現し、絶食や I 型糖尿病、授乳期などのケトン体の利用が重要となるときに発現が上昇する。欠損マウスでは、授乳期に成長障害が生じ、この時期を越すと普通の成長に戻る。このマウスはレプチン欠損の ob/ob マウスとの掛け合わせでも同様に授乳期の成長障害が起こることから、レプチンシグナルとは独立した要素によるものと判明した。さらに、成長ホルモンやインスリン様成長ホルモン値には野生型マウスと比べ同様の値を示し、体重あたりの摂食量、摂食関連ホルモンには無関係であった。

授乳後の AceCS2欠損マウスの解析では、通常食では授乳後1ヶ月程度で体重が野生型に追いつく。しかし、低糖高脂肪食では体重の増加の減少が見られた。以上のことから、このマウスの代謝障害の本態はケトン体の利用障害が予測され、授乳直後に低糖高脂肪食を与えると約50%のマウスが死亡した。生き残ったマウスも顕著な体重増加の低下が認められた。成熟マウスの解析では、絶食時には体温の低下が有意に起こり、トレッドミルの持久運動実験では持久力の低下が見られた。さらに、ケトン体利用が著しい I 型糖尿病のモデル動物であるストレプトゾトシン投与では野生型に比較し明らかな生存曲線の低下が認められた。以上より、AceCS2はケトン体である 3-hydroxy-butyric acid や acetoacetate を基質とすることが予測され、in vitro の実験を行ったところ、AceCS2は acetoacetate を基質( $K_m$  値;1mM) とし、アセテートと比較すると35%程度の基質特異性が認められた。絶食や I 型糖尿病のケトジェニックな状態ではケトン体が2-4mMまで上昇することから、十分に基質として可能な  $K_m$  値と考えられた。

以上より、AceCS2はケトジェニックな状態で転写が上昇し、ケトン体を基質とする酵素であること、そして、ケトン体をエネルギーとして有効利用が必要な I 型糖尿病などのときに必須な酵素であることを示すものであり、医学的見地からも重要な知見を提示するものであった。本審査は予備審査での審査員からの建設的な示唆・批判に対して、追加実験のデータ、論文構成の変更など下記の如く提示し論文に盛り込んだことを説明した。

審査の詳細は下記の通りである。

A. 予備審査に基づき実施した追加実験および修正点について

1. 論文構成の変更

予備審査時には、第2章 AceCS2 酵素活性の測定、第3章 AceCS2 欠損マウスの表現型解析となっておりましたが、第2章 AceCS2 欠損マウスの表現型解析、第3章 AceCS2 酵素活性の測定に順序変更。

## 2. 実験データの追加

AceCS2 欠損マウスにおける、AceCS2 タンパク質の発現確認のためのウェスタンブロッティングにおいて、内部コントロールを追加  
本研究においては C57B/6J の N6 系統のマウスを用いておりましたが、129 系統における表現型の確認を行った。

絶食時におけるトレッドミルによる持久運動

ストレプトゾトシン投与による 1 型糖尿病における表現型の解析

AceCS2 ノックアウトチェックに用いた配列の位置の提示

## 3. 制限酵素の表記の訂正

## 4. 実験データの削除

AceCS2 tissue distribution のウェスタンブロッティングの削除。

ミトコンドリア電子顕微鏡像の削除。

## 5. 本文の変更

第2章考察から脳における解析を削除した。

## 6. LacZ 染色

C57B/6J の N6 系統のマウスにおいては、LacZ により染色が見られず、ネオマイシンがノックインしていることにより染色が阻害されているのではないかと指摘があったので、CRE を発現するトランスジェニックマウスとかけあわせを行い、確認を行った。

審査員すべて変更点・追加点について良好であるとの意見であった。上記の点は学位請求論文に適切に盛り込まれた。

よって、本論文は博士（学術）の学位請求論文として合格と認められた。