

京都大学	博士 (工学)	氏名	松田 俊
------	---------	----	------

論文題目	ピルビン酸キナーゼ M2 とダイオキシン受容体の相互作用に関する研究
------	------------------------------------

(論文内容の要旨)

本論文は、解糖系の律速酵素ピルビン酸キナーゼ M2 (PKM2)と、環境微量汚染物質の一種であるダイオキシン類のほとんどの毒性作用を仲介する芳香族炭化水素受容体 (AhR)が相互作用することを示し、次にこの相互作用の意義及びその分子メカニズムを追求した研究結果をまとめたものであって、6章からなっている。

第1章は序論であり、研究背景としてダイオキシン類の胎児に対する高感受性、AhRの構造、機能及びその分子メカニズム、外因性及び生体・食品由来の AhR リガンドについて概観した。次に PKM2 の機能及びその分子メカニズム、PKM2 の発現制御、PKM2 の酵素活性の調節因子について概観した。

第2章は実験方法であり、本研究で用いた試薬及び機器、実験方法について記述した。

第3章は実験結果である。最初に PKM2 と AhR が相互作用することを示した。まず FLAG-HA-AhR を安定発現する HeLa 細胞を AhR リガンドのインディルビンに曝露した後、その核抽出液から精製した FLAG-HA-AhR 複合体を解析した結果、PKM2 を同定した。その後、PKM2 と AhR は AhR リガンド依存的に相互作用することを共免疫沈降により明らかにした。次に PKM2-AhR 相互作用の意義を調べたところ、PKM2 が AhR の標的遺伝子 *CYP1A1* の転写誘導を促進する事を PKM2 のノックダウン試験及び過剰発現試験により明らかにした。PKM2 が AhR 標的遺伝子の転写を促進する分子メカニズムを調べたところ、PKM2 の基質ホスホエノールピルビン酸、及び PKM2 のアロステリック活性化因子フルクトース-1,6-ビスリン酸が *CYP1A1* の転写誘導を促進したことから、PKM2 の酵素活性が AhR 標的遺伝子の転写誘導を促進することが示唆された。さらに AhR あるいは PKM2 のノックダウン HeLa 細胞を用いたクロマチン免疫沈降試験により、PKM2 が AhR 依存的に *CYP1A1* プロモーターにまで呼び寄せられることを明らかにした。PKM2 が AhR 標的遺伝子の転写誘導を促進する分子メカニズムをさらに調べた結果、PKM2 が p300 (ヒストンアセチルトランスフェラーゼ) の *CYP1A1* プロモーターへの呼び寄せ、及びプロモーター領域のヒストンアセチル化を促進することを、PKM2 ノックダウン HeLa 細胞を用いたクロマチン免疫沈降により明らかにした。さらに酵素活性のない PKM2 変異体の過剰発現試験により、*CYP1A1* プロモーター領域のヒストンアセチル化には PKM2 の酵素活性が必要であることを明らかにした。PKM2 の生成物ピルビン酸はミトコンドリアでピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 (PDC) によりアセチル補酵素 A に変換される。このアセチル補酵素 A はヒストンアセチルトランスフェラーゼの基質となることから、PDC が *CYP1A1* プロモーターに呼び寄せられるかどうかをクロマチン免疫沈降で調べた結果、PDC のサブユニット PDC-E2 が AhR リガンド依存的に *CYP1A1* プロモーターに呼び寄せられることを明らかにした。

第4章は考察である。本論文の研究成果より、「PKM2 と PDC はアセチル補酵素 A を転写活性化領域に供給する装置である」という仮説を提唱した。転写活性化領域のクロマチンはヒストンをアセチル化するためにアセチル補酵素 A が消費されることで、局所的

京都大学	博士 (工学)	氏名	松田 俊
<p>にアセチル補酵素 A の枯渇が生じる可能性がある。PKM2 と PDC はこの枯渇に対応するために転写活性化領域のクロマチンにまで呼び寄せられ、局所的にアセチル補酵素 A の濃度を高めているものと考えられた。また PKM2 をロックダウンしても AhR の <i>CYP1A1</i> プロモーターへの結合量は影響を受けず、<i>CYP1A1</i> の転写誘導も劇的に抑制されなかったことから、PKM2 が AhR による転写誘導に必ずしも必要ではないが、PKM2 が発現しているような活発に増殖する細胞では、AhR 標的遺伝子が誘導されやすくなっていることが示唆された。従って PKM2 の発現状況がダイオキシン類への感受性を規定している可能性があり、本論文の成果はダイオキシン類の毒性作用が成熟個体よりも胎児において顕著に現れるメカニズムを解明する上で重要な知見となると考えられる。</p> <p>第 5 章は結論であり、本論文の成果をまとめている。</p> <p>第 6 章は今後の課題についてまとめている。本論文で扱った AhR 標的遺伝子は <i>CYP1A1</i> のみだが、AhR は他にも数多くの遺伝子の転写誘導を行う。PKM2 がすべての AhR 標的遺伝子の転写誘導を制御するのか、特定の AhR 標的遺伝子を制御するのかを明らかにする必要がある。また PKM2 が直接 DNA に結合するのなら、PKM2 が認識する特異的な DNA 配列を特定する必要があると考えられる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

解糖系の律速酵素であるピルビン酸キナーゼ M2 (PKM2)は胎児期に特に高発現しており、本論文によってこの PKM2 が、環境微量汚染物質の一種であるダイオキシン類のほとんどの毒性作用を仲介する芳香族炭化水素受容体 (AhR) と相互作用することが見出された。この AhR と胎児期特異的な PKM2 の相互作用が、ダイオキシン類の毒性作用が胎児に対して特に顕著に現れることと関連があると考えられた。本論文は、まず PKM2 と AhR が相互作用することを示し、次にその意義と分子メカニズムについて研究した成果についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. PKM2 は AhR リガンド依存的に核内で AhR と相互作用する。
2. PKM2 は AhR リガンドによる *CYP1A1* の転写誘導を促進する。
3. PKM2 の基質ホスホエノールピルビン酸、及びアロステリック活性化因子フルクトース-1,6-ビスリン酸が AhR 標的遺伝子 *CYP1A1* の転写誘導を促進する。
4. PKM2 は AhR 依存的に *CYP1A1* プロモーターに呼び寄せられる。
5. PKM2 は p300 (ヒストンアセチルトランスフェラーゼ) の *CYP1A1* プロモーターへの呼び寄せ、及びそれに付随する *CYP1A1* プロモーターのヒストンアセチル化を促進し、ヒストンアセチル化には PKM2 の酵素活性が必要である。
6. ピルビン酸デヒドロゲナーゼの E2 サブユニットは AhR リガンド依存的に *CYP1A1* プロモーターに呼び寄せられる

以上より、本論文は PKM2 は AhR の活性化補助因子であることを明らかにした。従って、PKM2 の発現状況がダイオキシン類への感受性を規定している可能性がある。さらに PKM2 がピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体とともに転写活性化領域のクロマチンに局所的にアセチル補酵素 A を供給している可能性が示唆された。

本論文の成果は、ダイオキシン類の胎児に対する高感受性のメカニズムを知る上で重要な知見となり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平 24 年 8 月 22 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。