

氏名	たか だ い ち ろ う 高 田 伊 知 郎
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2360 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	脂 肪 酸 応 答 性 核 内 レ セ プ タ ー PPAR の 活 性 制 御 機 構 の 解 析

論文調査委員 (主査) 教授 竹市雅俊 教授 上村 匡 教授 七田芳則

論 文 内 容 の 要 旨

核内レセプター型転写因子群に属するPPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) は脂肪酸代謝物をリガンドとして遺伝子発現を調節し、脂質代謝や脂肪細胞分化などに重要な働きをなす。PPARは脂肪酸代謝物の他にも、多様な構造をもった合成化合物をリガンドとする。更にPPARリガンドとなる合成化合物は、血中脂質分が上昇する高脂血症や、糖尿病などに対し改善作用を示すため、より効果のあるリガンド合成が精力的に進められている。またPPARは、これらリガンドによる調節の他にも増殖因子やサイトカインシグナル等のシグナルとクロストークすることが知られており、これら因子が複雑に制御されることで脂質・糖代謝や脂肪細胞分化等が調節されている。そこで申請者はこのPPAR群による転写活性の調節機構に興味を持ち、以下の実験を行った。

まず第1にPPARのリガンド結合の分子機構に関する解析を行った。PPARは両生類と哺乳類において各3種類のサブタイプ遺伝子が報告され、アミノ酸配列の相同性から哺乳類ではPPAR, PPAR γ , PPAR δ , 両生類ではPPAR, PPAR β , PPAR γ と命名されている(以下, β , γ , δ と略)。しかしながら δ と β は比較的相同性が高いため同一のサブタイプ(β/δ)に分類されることもある。PPARではこれらサブタイプ間でリガンドが異なるが, β と δ では異なるリガンドが報告されている。そこで申請者は別種であるニワトリPPARを3種類同定し、サル腎臓由来繊維芽細胞CV1細胞を用いてリガンド依存的転写活性を測定した。その結果、興味深いことに、ニワトリにおける β/δ 相同遺伝子は β で報告されているリガンド(ベザフィブレート, GW2331), δ で報告されているリガンド(カルバプロスタサイクリン)両方をリガンドとすることを明らかにした。更に申請者は, δ はベザフィブレートに応答出来ないことも明らかにした。また、ヒト δ , ニワトリ β の変異体を作製しリガンド結合に関する領域を同定した結果、1アミノ酸残基(ヒト δ は417メチオニン, ニワトリ β は419バリン)が必須であることを見出した。この実験で用いたリガンドの中で、ベザフィブレートは高脂血症の改善薬として用いられており、その作用は α を介する可能性が高い。そこで次に、ヒト α , δ のアミノ酸配列を比較した。その結果、ヒト α はニワトリ β と同じメチオニン残基を有することが判明した。そこでこのアミノ酸残基の点変異体を作成しリガンド応答能を検討したところ、ベザフィブレート応答能が消失しただけではなく、他のリガンド応答能も低下することを見出した。以上の結果から、申請者は、PPARの種・サブタイプ選択的リガンド応答能が同じ位置で決定されること、PPARにおいて新たなリガンド認識能を得るためには一アミノ酸残基の変異で十分であることを新たに見出した。

第2に申請者はPPAR活性のクロストークによる制御として、PPAR γ とwnt関連因子に着目した。その理由は大腸癌、脂肪細胞などでPPAR γ とwntシグナルの両方が分化や増殖に関わるため、これら間に何らかのクロストークの可能性があるが、その分子機構は不明なためである。そこで申請者はwntシグナルを正に制御する β カテニン/Tcf複合体と、負に制御するMARキナーゼNLK (Nemo Like Kinase)のPPAR γ 転写活性化能に対する影響を、培養細胞を用いて検討した。その結果、 β カテニン/Tcf, NLK両方がPPAR γ 機能を抑制することを見出した。

更に申請者はNLKに着目して解析を行った結果、以下の知見を得ることが出来た。まずNLKの欠損変異体を作製し、

PPAR γ 抑性能を検討した結果、NLK の PPAR γ 抑制には NLK 特異的な C 末端の配列を必要とすることを見出した。さらに免疫共沈降法を用いて NLK と PPAR γ の複合体形成能を検討した結果、2 者は NLK の活性依存的に複合体を形成することを見出した。次に *in vitro* リン酸化法を行った結果、PPAR γ の N 末端が NLK によってリン酸化できることを明らかにした。また NLK による PPAR γ 機能抑制の分子機構を検討した結果、NLK は PPAR γ の DNA 結合能を阻害することでその機能を抑制することを見出した。以上の結果、申請者は新たに PPAR γ と Wnt シグナル関連因子のクロストークを見出し、特に NLK に関し抑制分子機構を解明した。

以上、申請者の研究により、PPAR による転写活性化の制御機構として、リガンド結合様式、シグナルのクロストークについて新たな知見を得ることが出来た。これらの結果は脂質代謝の調節機構、細胞分化等における分子機構の一端を解明するものである。

論文審査の結果の要旨

脂質・糖代謝や細胞分化に関与する核内レセプター型転写因子群 PPAR は脂肪酸派生物をリガンドとして直接結合し、標的遺伝子の転写を制御する。PPAR はこのようなリガンド依存的な転写制御の他にも増殖因子、サイトカインシグナルによっても制御される例が知られている。しかしこれらの分子機構にはまだ未知な点が多いため、申請者はこの PPAR による活性の制御機構に関心を持ち、以下の解析を行った。その結果、新たな知見を見出すことに成功した。

まず第 1 に PPAR のリガンド結合の分子機構に関する解析を行った。PPAR 遺伝子は哺乳類、両生類で 3 種類のサブタイプが単離されている。しかし哺乳類で δ 、両生類で β と呼ばれるサブタイプはその相同性にも関わらず、報告されているリガンドが異なる。そこで申請者は更に鳥類（ニワトリ）の PPAR を 3 種類単離し、そのリガンド依存的な転写活性化能を検討した。その結果申請者はニワトリの β/δ 遺伝子は、ヒト δ 、ツメガエル β の両方にリガンド結合することを明らかにした。また δ リガンドは β を活性化したが、 β リガンドは δ を活性化できないことを示した。更に申請者は幾つかのヒト δ ・ニワトリ β 変異体の発現ベクターを作成した結果、 β リガンドを選択的に認識する領域は、C 末端側に位置する 1 アミノ酸残基であることを明確にした。また β リガンドとして示された化合物はヒト α も活性化するので同じ領域のアミノ酸配列を検討した。その結果、ニワトリ β と同様な配列であり、申請者はこの位置のアミノ酸配列を置換すると β リガンド応答能を消失することも見出した。またこの変異体は他の化合物に対する応答能も低下した。以上の結果から、申請者は PPAR のサブタイプ・種間のリガンド応答能を比較することによって、PPAR リガンドである高脂血症改善薬ベザフィブレートと PPAR の結合様式に新たな知見を見出した。これは β/δ の種差での機能差を示唆すると共に、今後の高脂血症改善薬の合成の情報に多大な貢献をもたらす。また α において、ベザフィブレートを認識するアミノ酸残基が、リガンド応答能を低下させることから、脂質代謝の異常等、遺伝的疾患の可能性も示唆する結果を得た。

第 2 に申請者はリガンド非依存的な PPAR 活性制御として、特に PPAR γ と Wnt シグナル抑制因子 NLK に着目した。その理由は、NLK は Wnt シグナル活性を抑制するが、PPAR γ も Wnt シグナルによる制御の可能性が報告されていたからである。しかしこれらの因子の相互作用について未知であった。実験の結果、申請者は NLK が PPAR γ の転写活性化能を抑制することを新たに見出した。更にこの抑制がキナーゼ領域に加え、NLK 特異的な配列も必要であることを見出した。また申請者は NLK が PPAR γ をリン酸化可能であること、しかしながら PPAR γ がリン酸化されなくても NLK の抑制に影響がないことを明らかにした。更に NLK による PPAR γ 抑制の分子機構の解明を検討した結果、NLK が PPAR γ の DNA 結合能を阻害することを初めて示した。これらの研究結果は、PPAR γ シグナルと MAP キナーゼシグナルの新たなクロストークを示しており、今後の脂質代謝調節や細胞分化の研究に多大な貢献をするものである。最後に、申請者の最も大きな貢献は、PPAR のリガンド結合機構、異種シグナルとのクロストークを示すことによって、高脂血症、糖尿病、肥満等の研究分野に新たな広がりを持たせたことである。

よって、申請論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認められる。なお、平成13年2月5日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。