

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	永井 宏幸
論文題目	Studies on endogenous ligands of peroxisome proliferator-activated receptor γ regulating adipocyte metabolism by four-base codon and stable isotope techniques. (4塩基コドン法および安定同位体法を活用した脂肪細胞代謝を制御するペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ の内因性リガンドに関する研究)		
(論文内容の要旨)			
近年、世界的規模でみた死因は、がんを抜いて動脈硬化性疾患が第1位となっている。糖尿病や高脂血症などの糖・脂質代謝異常症は、肥満が主要因であり、動脈硬化性疾患の主要なリスクファクターである。肥満に伴う生活習慣病の増加は社会的問題となってきた。本研究は、受容体型核内転写因子であるペルオキシソーム増殖剤応答性受容体γ (PPARγ)の活性調節に焦点を当て、4塩基コドンを用いたピンポイント蛍光法および安定同位体追跡法を活用することで、脂肪細胞の分化メカニズムおよび糖・脂質代謝制御機構の解析を行うことを目的としたものであり、その成果は以下のように要約される。 1. PPARγは結合するリガンドによってリクルートする転写共役因子が異なり、それにより発現を促す遺伝子群も異なることが知られている。このリクルートメントの選択性が、同じPPARγリガンドであっても、その生体への影響が異なる要因であるが、転写共役因子を選別してリガンドスクリーニングする手法はいまだ開発されていない。そこで、転写共役因子の選別までを考慮に入れたPPARγのリガンドスクリーニング手法の開発を試みた。転写共役因子として、Steroid receptor co- activator-1 (SRC-1)に着目し、検討した。このSRC-1遺伝子に非天然アミノ酸をコードする4塩基コドンを導入して、蛍光色素とともに発現させ、蛍光標識SRC-1とPPARγのリガンド依存的な相互作用を蛍光偏光で検出を試みたところ、リガンド濃度依存的に蛍光強度は飽和曲線を示し、スキャッチャードプロットから各解離定数が算出できた。また、本手法を用いるスクリーニングにより、イソプレノイド生合成経路のメバロン酸代謝物であるファルネシルピロリン酸 (FPP) が新たに見出され、PPARγの新規内因性リガンドとしての可能性を示した。 2. 脂肪細胞の糖・脂質代謝を定量的に評価するため、分化誘導させた培養脂肪細胞にトレーサーとして安定同位体グルコースを添加し、高感度液体クロマトグラフ質量分析法で代謝物を測定した。その結果、安定同位体グルコースから脂肪細胞内で新たに合成されたパルミチン酸、オレイン酸等の主要な脂肪酸が高感度で検出できた。また、グルコースの細胞内への取り込みや脂肪分解などの主要な活性についても同時に定量することができた。この手法を用いてFPPの脂肪細胞代謝への影響を分析したところ、細胞内へのグルコース取り込み量並びに脂肪酸合成			

活性が増加することが明らかとなった。これらの結果からFPPが脂肪細胞の代謝制御機構に関与していることが示唆された。

3. FPPが、PPAR γ の内因性リガンドであるかどうかについて各種の検証を行った。

FPPのPPAR γ 転写活性化能をレポーターアッセイにより測定したところ、他のメバロン酸代謝物に比べて非常に高い活性化能力を有していることが分かった。また、FPPはPPAR γ とコアクチベーターとの相互作用を増加させ、その相互作用はPPAR γ アンタゴニストによって選択的に阻害された。結合シミュレーションでは、FPPはPPAR γ に直接的に結合していることが示唆された。PPAR γ が中心的な役割を果たす脂肪細胞分化過程におけるFPPの生理的役割を検討するため、培養前駆脂肪細胞において、FPPが標的遺伝子の発現を誘導しているかどうかについて調べたところ、PPAR γ の主要な標的遺伝子の発現量が増加していた。さらに、イソプレノイド合成経路の阻害剤を用いて、脂肪細胞内でのFPPの生合成を制御したところ、細胞内FPP量とPPAR γ の標的遺伝子発現量並びに細胞内脂肪蓄積量において正の相関が見られた。これらより、FPPが脂肪細胞においてPPAR γ の内因性リガンドとして糖・脂質代謝を制御していることが示唆された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

飽食状況下にある経済的先進諸国において、肥満より派生する、糖尿病や動脈硬化症をはじめとする糖・脂質代謝異常症の増加が社会問題となってきた。PPAR γ はリガンド依存的な核内転写因子であり、生体の糖・脂質代謝調節において中心的な役割を担っている。本論文は、PPAR γ の内因性因子に着目し、新規測定手法を活用することで、脂肪細胞の糖・脂質代謝制御機構の解析を行ったものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. PPAR γ の機能はリクルートする転写共役因子によって異なることが示唆されており、多様な転写共役因子とPPAR γ との相互作用を明らかにすることが、脂肪細胞の代謝制御機構解明に重要である。本論文では、4塩基コドンを用いたピンポイント蛍光法によって、転写共役因子選択的かつ高感度なPPAR γ リガンドアッセイ系を確立した。この手法を用いるスクリーニングにより、イソプレノイド生合成経路のメバロン酸代謝物であるFPPを新たに見出し、PPAR γ の内因性リガンドとしての可能性を示した。
2. 脂肪細胞の糖・脂質代謝を定量的に評価するため、安定同位体追跡法を用いて検討した。安定同位体標識グルコース中の炭素を高感度液体クロマトグラフ質量分析法で追跡したところ、脂肪細胞の主要な代謝である脂肪酸生合成、脂肪分解やグルコース取り込み等について同時に定量しうることを示した。
3. FPPがPPAR γ の内因性リガンドであるかどうかを検証した。レポーターアッセイにより、FPPはPPAR γ の転写活性化能力を有していること、また、結合アッセイおよび結合ミュレーションにより、FPPはPPAR γ に直接的に結合していることが示唆された。また、脂肪細胞内でのFPP量の増減とPPAR γ の標的遺伝子の発現量および脂肪蓄積量の増減が連動することを明らかにした。これらより、FPPが脂肪細胞においてPPAR γ の内因性リガンドとして糖・脂質代謝を制御していることを示唆した。

以上のように、本論文は、脂肪細胞の糖・脂質代謝を制御する内因性因子についてはじめて詳細に検討し、イソプレノイド生合成経路のメバロン酸代謝物であるFPPが、PPAR γ の内因性リガンドとして機能していることを明らかにしたものであり、食品機能学、酵素化学、農産製造学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成23年9月8日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。要旨公開可能日： 年 月 日以降