

## 審査の結果の要旨

氏名 丸山 竜人

食の欧米化や慢性的な運動不足に伴い肥満人口は過去 40 年間で 3 倍となっている。肥満には皮下脂肪型肥満と内臓脂肪型肥満があり過剰な内臓脂肪蓄積による肥満は糖尿病や動脈硬化などの生活習慣病の危険因子であることが知られている。

小胞体ストレスは、小胞体内に異常な立体構造をしたタンパク質が蓄積することで発生し、高脂肪食やレプチン欠損マウスなどの研究から小胞体ストレスと生活習慣病との関連が考えられている。

ATF6 $\alpha$ は小胞体ストレスによって活性化される転写因子である。小胞体ストレスが起こると ATF6 $\alpha$ は小胞体膜上からゴルジ体に移行し、転写活性化領域を含む領域が切断され、核内へ移行する(プロセッシング)。さらに、ATF6 $\alpha$ の SNP の 1 つである M67V は転写活性化能が亢進し血中 LDL コレステロール及び ApoB 分泌が増加する報告がなされている。

FGF21(Fibroblast Growth Factor 21)は主に肝臓で発現する内分泌性の線維芽細胞増殖因子である。絶食時に FGF21 の発現は核内受容体 PPAR $\alpha$ により増加し、脂肪酸代謝の活性化やインスリン抵抗性を改善する。また、FGF21 と同じサブファミリーに属する FGF19 の発現が小胞体ストレスにより亢進する。

これらの結果から、小胞体ストレス応答因子である ATF6 $\alpha$ と脂質代謝及び抗生活習慣病因子 FGF21 と小胞体ストレスとの関連性に着目し、制御機構及び生理的意義の検討を行った。

ATF6 $\alpha$ によるコレステロール生合成遺伝子の発現制御を検討するため、ヒト肝癌由来 Huh7 細胞にアデノウイルスを用いて核内型 ATF6 $\alpha$ を過剰発現し遺伝子発現解析を行った。その結果、ATF6 $\alpha$ の標的遺伝子である BiP と同様にコレステロール合成に重要な遺伝子の発現増加が見られた。

次に、ATF6 $\alpha$ による発現制御機構を検証するためコレステロール生合成遺伝子のプロモーター解析を行った結果、ATF6 $\alpha$ によるこれら遺伝子のプロモーター活性の有意な上昇が見られた。

さらに、ATF6 $\alpha$ によるコレステロール合成を検討するため、Huh7 細胞にアデノウイルスを用いて核内型 ATF6 $\alpha$ を過剰発現させ、放射性ラベルされた酢酸を用いて新規コレステロール合成量を測定した。その結果、ATF6 $\alpha$ がコレステロールの新規合成を亢進することが示された。さらにクロマチン免疫沈降法を用いた検討の結果、核内型 ATF6 $\alpha$ はコレステロール生合成遺伝子のプロモーター領域の NF-Y 結合部位にリクルートされることが示された。以上の結果から、

ATF6 $\alpha$ はコレステロール合成遺伝子の発現制御を介してコレステロール合成を促進することが示された。

小胞体ストレスによる FGF21 の発現を検討するため、マウス初代培養肝細胞やマウス個体に小胞体ストレス誘導剤を処理し遺伝子発現解析を行った結果、小胞体ストレスマーカーである BiP と同様に FGF21 の発現が顕著に増加した。この発現調節が小胞体ストレス応答因子 ATF4 を介していることや、FGF21 プロモーター上に ATF4 結合領域である AARE 配列を 3 か所同定したことから FGF21 が ATF4 高感受性因子であることが示唆された。

次に、FGF21 欠損マウスを用いて FGF21 の小胞体ストレスにおける機能について検討した。野生型(C57BL/6J)及び FGF21 欠損マウスに小胞体ストレス誘導剤を投与したところ、BiP などの小胞体ストレスマーカーの遺伝子発現が野生型マウスと比較して FGF21 欠損において増加していた。またアデノウイルスを用いて FGF21 を過剰発現させたマウスにおいては、小胞体ストレスマーカーの発現低下が見られた。さらに、ストレス誘導性アポトーシス関連因子である CHOP の発現や JNK の活性化が FGF21 によって変動していたことから FGF21 が小胞体ストレス及びストレス誘導性アポトーシスを抑制している可能性が考えられる。

糖尿病や脂肪肝による小胞体ストレスの報告があることから、FGF21 がこれらの病態に関与するかを検討した。非アルコール性脂肪肝誘導食であるメチオニン・コリン欠乏食をマウスに与えた結果、肝臓での FGF21 遺伝子発現及び血中レベルの増加が確認された。またメチオニン・コリン欠乏食を FGF21 欠損マウスに 4 週間摂食させた結果、野生型マウスと比較して肝臓トリグリセリド量の増加が確認された。また、脂質蓄積に関与する PPAR $\gamma$ 及びその標的遺伝子の肝臓での発現が野生型と比較して FGF21 欠損マウスでは増加した。以上の結果から、FGF21 が PPAR $\gamma$ を介して肝臓の脂質蓄積に関与することが示唆された。

さらに、マイクロアレイ法による ATF4 の新規標的遺伝子の網羅的な探索を行った。マイクロアレイの結果から ATF4 による誘導を受ける上位の遺伝子について ATF4 過剰発現やノックダウン実験等を用いて検証した。その結果、C12orf39、CSTA、CALCB 遺伝子が ATF4 の新規標的遺伝子であることが示唆され、C12orf39 のプロモーター活性は AARE を介して ATF4 により発現制御を受けることが示された。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。