

## 審査の結果の要旨

氏名 山村 淳貴

本論文は培養細胞や実験動物を利用して、肝臓において必須アミノ酸の欠乏に応答して発現変動する miRNAs が存在し、またこうした miRNAs がアミノ酸欠乏に対する生体応答の重要な役割を持つことを示唆したものである。本論文は 3 つの部分から構成される。まず第一部ではヒト肝臓ガン由来 HepG2 細胞において必須アミノ酸の 1 つであるロイシンの欠乏に応答して発現上昇する 12 種の miRNAs を、マイクロアレイを利用した網羅的解析によって抽出した。また、こうした miRNAs の標的遺伝子探索手法の検討として、トランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析との比較解析を行い、プロテオーム解析の利用が有効と判断した。

次いで第二部では、こうした miRNAs の発現調節機構の解明に着手した。ここでは必須アミノ酸欠乏時に特異的な翻訳活性化が誘導される転写因子 ATF4 に着目している。ATF4 の過剰発現プラスミドを導入した HepG2 細胞において発現上昇する 203 種の miRNAs を第一部と同様にマイクロアレイを利用した解析によって抽出した。これと第一部で見出された 12 種の miRNAs と比較したところ、両実験に共通して発現上昇した miRNAs として hsa-miR-663a および hsa-miR-1469 を見出した。更にタイムコース試験によってロイシン欠乏下においてこれら 2 つの miRNAs が継続的に高値を示すこと、また siRNA を利用したノックダウン解析において、ロイシン欠乏下でのこれら miRNAs の発現上昇が ATF4 のノックダウンによってキャンセルされたことから、こうした miRNAs が ATF4 に直接的に制御を受けていることが示唆された。

更にロイシン欠乏下での細胞内プロテオームデータとの統合解析によって、hsa-miR-663a の標的遺伝子として PRAS40 を見出した。hsa-miR-663a の過剰発現を施した HepG2 細胞では PRAS40 のタンパク質発現量の低下が認められ、実際に標的遺伝子であることが確認されたほか、mTORC1 の下流因子である p70S6K のリン酸化レベルが低下していた。PRAS40 は mTORC1 の構成因子の 1 つであり、その活性調節には重要な役割を果たすことが知られている。従って本論文の結果はアミノ酸欠乏下での mTORC1 の活性調節機構への miRNAs の関与を示唆している。

第三部では、より生体情報を反映できると考えられる実験動物モデルを利用した。C57BL/6J マウスにロイシン欠乏食を 7 日間給餌させたところ、体重および肝臓重量、骨格筋重量の低下や、血糖値、血中脂質含量の低下が認められた。こうした生体応答に対する miRNAs の寄与を検討するため、まずマウス肝臓の miRNAs 発現プロファイル

を調べたところ、マウス肝臓で発現上昇する mmu-miR-182-5p および mmu-miR-193a-3p、mmu-miR-193b-3p を見出した。更にこうした miRNAs の機能解析として、マウス肝臓プロテオームデータとの比較解析や、マウス肝臓 AML12 細胞でこうした miRNAs を過剰発現させることで、標的遺伝子として CD2AP および YWHAZ を同定した。またこれら miRNAs の過剰発現を施した AML12 細胞では p70S6K のリン酸化レベルの低下や、脂質生合成の低下、更に広範な細胞死が認められたことから、miRNAs が mTORC1 の活性低下などを介してロイシン欠乏に応答している可能性が示唆された。これらの結果から、実験動物モデルにおいてもロイシン欠乏を下流に伝達する因子としての miRNAs の役割を提唱することが出来た。

以上 3 部の内容から、必須アミノ酸欠乏に応答し肝臓細胞で発現上昇する miRNAs が存在し、mTORC1 の活性の調節などを介して生体応答に寄与している可能性が示唆された。今後単一アミノ酸欠乏モデルにとどまらず、様々な栄養状態の変化に応じて発現変動する miRNAs やその役割を明らかにしていくことで、miRNAs を標的とした機能性食品開発や創薬など、様々な分野での応用が期待され、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。