

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 吉原 英人

インスリンとインスリン様成長因子 (IGF) は構造が類似したペプチドホルモンで、インスリンは糖をはじめとした物質代謝の恒常性維持などに、IGF は正常な発生や成長、老化などに重要な役割を担っている。一般にインスリン/IGF が細胞膜上に存在するそれぞれの受容体に結合すると、受容体チロシンキナーゼが活性化し、インスリン受容体基質 (IRS) がチロシンリン酸化される。これを引き金として phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 経路などの下流シグナル経路が活性化、インスリン/IGF の生理活性が発現する。これまで、生体のおかれた生理・栄養状態に応答して、標的細胞でのインスリン/IGF の細胞内シグナル・生理活性が修飾・調節されることが明らかにされており、この機構を介して生体の恒常性維持が可能となっている。一方、この制御が破綻しシグナルが長期にわたって抑制されると糖尿病や成長遅滞が、過剰に増強されると過成長や癌化など種々の疾病が発症する。したがって、これらの分子機構を明らかにすることは急務である。インスリン/IGF の細胞内シグナル・生理活性の修飾・調節機構を解析する過程で、申請者の研究グループでは、IRS が複数の脱ユビキチン化酵素 (DUB) と相互作用することを見出している。これまで、IRS が複数のユビキチンリガーゼ (E3) よってユビキチン化 (Ub 化) されるとプロテアソームで分解され、インスリン/IGF 応答性が低下することが報告されているが、IRS の脱 Ub 化制御については全く解析が行われていない。本研究は、同定された DUB の中で IRS と特に強い相互作用が観察された USP7 に着目し、USP7 が IRS の Ub 化、インスリン/IGF 応答性の調節に果たす役割を解明することを目的としている。

論文は、序章、材料と方法、続いて本論が四章、そして総合討論などからなっている。

序章では、本研究の背景および意義を概説し、本研究の目的と本論文の構成について述べている。

第一章では、USP7 と IRS の相互作用を解析し、USP7 が IRS の複数の分子種のうち IRS-2 とのみ相互作用することを明らかにし、更に、IRS-2 に対する USP7 をプローブとした Far-Western blotting により、IRS-2 と USP7 が直接相互作用することが示した。種々の領域を欠失した IRS-2 変異体と USP7 変異体を用いた pull-down assay の結果も併せると、一分子の IRS-2 の種々の領域に、USP7 分子が複数相互作用していると考えられた。

第二章では、USP7 による IRS-2 の Ub 化制御および量に及ぼす影響について解析している。IRS-2 の Ub 化サイトを MS により解析した結果、80、811、1106、1134 番目のリジン残基の Ub 化が対照細胞に比べて増加しており、USP7 は IRS-2 のマルチプルモノユビキチン化を脱離させる活性を有することが明らかとなった。Ub 化された IRS は一般にプロテアソームを介して分解されることが知られている。そこで USP7 が IRS-2 の分解に及ぼす影響を解析した結果ところ、USP7 は IRS-2 を脱 Ub 化し、IRS-2 の Ub-プロテアソーム系による分解を抑制していることがわかった。

第三章では、IRS-2 と USP7 の相互作用を変動させる細胞外因子を探索した。その結果、インスリンあるいは IGF-I で標的細胞を短時間処理した際に、IRS-2 から USP7 が解離し、その後 IRS-2 が分解されることが明らかとなった。続いて、インスリン/IGF 刺激に応答して USP7 が IRS-2 から解離する機構を検討し、IRS からの USP7 の解離には、インスリン/IGF 刺激に応答した PI3K 経路の活性化を介した IRS-2 のセリン/スレオニンリン酸化が重要であることを発見した。

第四章では、IGF 刺激に応答して変動する Ub 化基質の網羅的解析を行った。申請者が開発した新手法により、IGF 刺激に応答して 125 種類の Ub 化ペプチドの量が増加することがわかった。そこには刺激に応答して Ub 化、分解されることが知られている既知の分子以外に、転写阻害因子などをはじめとした新規基質が含まれていた。

これらの結果をもとに、総合討論では、本研究の成果がインスリン様シグナルの新しい制御機構の解明に、どのように寄与しているかを討論している。

このように本研究は、IRS に相互作用する USP7 が、インスリン様シグナルの維持やその脱感作に重要な役割を果たしていることをはじめて明らかにしたもので、学術上・応用上貢献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）の学位として価値あるものと認めた。