

氏名(本籍)	ひろ た けい こ 廣 田 恵 子(大 分 県)
学位の種類	博 士(農 学)
学位記番号	博 甲 第 3088 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Analysis for HNF-4-Mediated Transcriptional Regulation (HNF-4 による転写活性化機構の解析)
主 査	筑波大学教授 農学博士 馬 場 忠
副 査	筑波大学教授 農学博士 小 林 達 彦
副 査	筑波大学教授 農学博士 深 水 昭 吉
副 査	筑波大学教授 農学博士 田 仲 可 昌

論 文 の 内 容 の 要 旨

転写因子はプロモーターやエンハンサー上の特異的配列に結合し、タンパク相互作用を介して RNA Polymerase II に情報を伝え遺伝子の発現を制御する因子である。HNF4 を核内レセプタースーパーファミリーに属する転写因子で肝臓で多く発現し、多くの遺伝子の転写活性化を介して脂質代謝や糖代謝などの恒常性の維持に重要な役割を果たしていることが知られている。

本論文では、分子生物学的アプローチを用いて HNF4 の恒常性維持へ果たす役割について明らかにすることを目的に研究を行っている。まず、血圧調節に重要であるアンジオテンシノーゲン (ANG) 遺伝子の肝臓特異的な発現への HNF4 の関与について解析を行った。その結果、ヒト肝臓由来の細胞株 HepG2 において、HNF4 の発現ベクターの量に依存した再構成 ANG 遺伝子の転写活性化が認められ、また、HNF4 と拮抗して働く転写抑制因子 COUP を発現させることにより、量依存的な転写抑制が認められた。様々な欠失変異体も用いて解析したところ、HNF4 は C 領域 (-429 ~ -386) と J 領域 (-281 ~ -252) のプロモーター上の 2 ヶ所で強力に活性化作用を示し、COUP は C, J 領域において HNF4 と拮抗し、Downstream Enhancer のコア領域である GM (+1399 ~ +1438), ME (+1435 ~ 1478), 及び d61-2 (+2191 ~ +2214) を抑制した。マウス肝臓の核抽出液を用いたゲルシフトアッセイやスーパーシフトにより、C と J には HNF4 が結合し、GM, 及び ME に COUP が結合することを明らかにした。d61-2 に直接には COUP は結合しなかったが、そこに作用する因子の結合を阻害することが明らかになった。これらのことから、HNF4 は ANG 遺伝子の肝臓特異的な発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に、HNF4 のインスリン応答性の検討を行った。FKHR はインスリン依存的にリン酸化され、それにより細胞質へ移行する転写因子である。最近 FKHR が DNA 結合性の転写因子としてだけでなく、核内レセプタースーパーファミリーに属するエストロゲンレセプターのコファクターとしても働くことが報告されている。そこで本論文では FKHR が HNF4 のコファクターとしても働きうるかについて検討を行い、その結果、FKHR は *in vivo*, *in vitro* において HNF4 と結合すること、また HNF4 を介した転写活性を強く抑制することを示した。さらに、FKHR の転写抑制効果がインスリンにより制御されるかについて検討し、FKHR の転写抑制効果はインスリン依存的に解除されることを見いだした。これにより、HNF4 を介した転写活性は FKHR を介してインスリンにより制御されていることが示された。

審査の結果の要旨

HNF4が様々な生理機能に重要であることは示唆されていたが、その詳細については不明な点が多い。この論文では、HNF4の恒常性維持に果たす役割を明らかにすることを目的に実験を行い、その結果、HNF4は血圧調節に重要な役割を果たすこと、またHNF4の転写活性はインスリンにより制御される可能性があること、以上の2点を明らかにしている。

近年、HNF4が若年発症型糖尿病 (MODY) の原因遺伝子であることが報告されたが、その発症メカニズムは未だ明らかになっておらず、またHNF4の活性とインスリンとの関係も不明であった。本研究によって、HNF4の転写活性とインスリンの関係が明らかにされたことは若年発症型糖尿病 (MODY) の発症機序解明につながる可能性も含んでいると考えられる。また、これまでにHNF4と血圧制御との関与報告されておらず本研究によりはじめて明らかにされたといえ、これらの点では評価できる。一方、個体レベルでのHNF4の機能に関する解析までは研究が到達しておらず、今後課題も残されている。しかし、研究自体は非常に注意深く行われており、十分な信頼性を有していると判断でき、当該研究分野の発展に十分な貢献をしたと判断できる。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。