



GATA2 mediates thyrotropin-releasing hormone-induced transcriptional activation of the thyrotropin β gene.

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-05-15 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大場, 健司 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2670

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 493号	学位授与年月日	平成23年12月 9日
氏 名	大 場 健 司		
論文題目	GATA2 mediates thyrotropin-releasing hormone-induced transcriptional activation of the thyrotropin β gene. (GATA2はTRHによるTSH β 遺伝子の転写活性化を調節する)		

博士(医学) 大場 健 司

論文題目

GATA2 mediates thyrotropin-releasing hormone-induced transcriptional activation of the thyrotropin β gene.

(GATA2 は TRH による TSH β 遺伝子の転写活性化を調節する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

Thyrotropin-releasing hormone (TRH)による thyrotropin (TSH)の産生促進、および甲状腺ホルモン(T₃)と甲状腺ホルモン受容体(TR)による抑制は、視床下部-下垂体-甲状腺系の中心的機構である。TSH は α 鎖(TSH α)と β 鎖(TSH β)より構成されるが TSH の特異性を規定するのは TSH β であり、TRH 刺激は TSH 分泌を増加させるほか TSH α と TSH β の遺伝子発現も促進する。

転写因子 GATA2 は下垂体特異的転写因子 Pit1 とともに TSH 産生細胞への分化における決定因子であり、TSH β 遺伝子発現にも必須とされる。しかし、TRH 刺激による TSH β 遺伝子発現の活性化に関しては、Pit1、TSH β に存在する抑制性の T₃ 応答領域(nTRE)、T₃ の結合していない TR などの関与が報告されているが、GATA2 に関する報告はない。一方、TRH 以下のシグナル伝達に関しては、蛋白キナーゼ C (PKC)、蛋白キナーゼ A (PKA)あるいは MAP キナーゼ(MAPK)などの関与が報告されているが、GATA2 を考慮した実験系での検討はない。そこで、TRH 刺激による TSH β 遺伝子の転写活性化を GATA2 と TRH 以下のシグナル伝達を中心に検討した。

[材料ならびに方法]

TSH β 、プロラクチン(PRL)、エンドセリン-1 (ET-1)、TSH α の各プロモーターを持つ chloramphenicol acetyltransferase (CAT)あるいは Renilla ルシフェラーゼ遺伝子を Pit1、GATA2、TRH 受容体(TRH-R)、TR などの発現プラスミドとともに腎由来 CV1 細胞、GH 産生細胞 GH3、TSH β 産生細胞 TaT1 ヘリン酸カルシウム法ないしリポフェクション法で遺伝子導入し、TRH、PKC 活性化剤 tetradecanoylphorbol acetate (TPA)、PKA 活性化剤 forskolin、種々の PKC あるいは MAPK 阻害剤の刺激下で転写活性を調べた。また GATA2 を発現した CV1 細胞の核抽出液を用い、³²P で標識した TSH β 遺伝子の GATA 応答領域(GATA-RE)との結合を、電気泳動移動度シフト法(EMSA)にて解析した。

[結果]

- (1) CV1 細胞に Pit1 と GATA2 を共発現することで TSH β プロモーターをもつ CAT レポーター遺伝子(TSH β -CAT)は著明に活性化し、TRH-R を共発現して 100 nM の TRH を添加するとその転写活性は更に 2 倍に増強した。同様の結果を TPA 添加時にも認めたが forskolin 添加時には認めなかった。また nTRE を破壊しても TRH 刺激による転写活性化は認められた。
- (2) TSH β プロモーターの GATA-RE の直下に存在する抑制性の配列を欠失すると、GATA2 単独で基礎の転写活性を維持できることが報告されている。この転写活性は GATA2 発現下で TRH 刺激により 2 倍程度に増強した。また GATA-RE を持つ ET-1 および TSH α プロモ-

ターの転写も、GATA2 を共発現することで TRH 刺激により活性化した。一方、DNA 結合能を破壊した GATA2 変異体を共発現した場合には、TRH 刺激による転写活性化を認めなかった。(3) T3 非存在下では TR のみを過剰発現しても TRH による TSH β -CAT の転写活性化を認めなかった。一方、T3 存在下の TR は GATA2 と十分量の TRH で活性化された TSH β -CAT を基礎転写レベルまで抑制した。(4)欠失解析の結果、TRH および TPA による転写活性化には GATA2 の Zn フィンガー(Zf)領域が重要であることが示された。(5) GATA2 は Zf 領域で TSH β の GATA-RE を認識することが報告されている。EMSA による検討で、GATA2 の DNA 結合は TRH および TPA 刺激により増強された。(6)内因性に Pit1、TRH-R、Ets、PRL を発現する GH3 細胞に GATA2 を共発現したところ、TRH 刺激による TSH β の転写活性化が再現された。しかし主に転写因子 Ets を介して活性化する PRL プロモーターと異なり、MAPK 阻害薬による影響を受けなかった。(7) TSH 産生細胞として樹立されている T α T1 をウエスタンブロットで検討したところ、意外な事に GATA2 の発現は不十分だった。GATA2 を共発現しない条件では TRH 刺激により TSH β 転写は活性化しなかったが、GATA2 の共発現により TSH β の転写活性化が再現された。

[考察]

TRH 刺激による TSH β 遺伝子の転写活性化を媒介する標的は GATA2 であることが示された。nTRE あるいは T3 の結合していない TR は不要であり、条件を選べば Pit1 も必須でないことが判明した。既報の多くは GATA2 がほとんど発現していない実験系を用いているため、異なる結果に至ったと考えられた。一方、T3 存在下では TR によって TSH β の転写は抑制され、TRH による転写活性化よりも優位であった。以上の結果は TR、TRH、TRH-R、PAX8 あるいは下垂体特異的 GATA2 のノックアウトマウスの報告を矛盾なく説明するものであった。

TRH 以下のシグナル伝達に関しては、TSH β の転写活性化は PKC を介することが示された。PRL と異なり MAPK の関与は否定的であり、異なる転写因子(GATA2 と Ets)の関与によりシグナル伝達の相違が生じていると推察された。

[結論]

GATA2 は TRH による TSH β の転写活性化と T3 による抑制において、共通の標的因子として機能する。

論文審査の結果の要旨

今までの研究から、甲状腺刺激ホルモン産生細胞 Thyrotrope では、この細胞特異的に TSH β が発現しており、転写因子 GATA2 は転写活性化に働き、また転写因子 Pit1 は活性化と脱抑制により転写を活性化することが判明している。

申請者は甲状腺ホルモン放出因子 (TRH) が TSH β 遺伝子を誘導する分子メカニズムを明らかにすることにした。適当な Thyrotrope 細胞株がないので、実験系には、CV1 細胞に Pit1 と GATA2 発現ベクター、そして TSH β -CAT レポーターを共遺伝子導入して、CAT 活性を測定する方法を用いた。CV1 細胞で TRH に対する作用を見るために、TRH 受容体 TRH-R 発現ベクターも同時に遺伝子導入した。上記 4 DNA を遺伝子導入した後、メディウムに TRH

を添加すると濃度依存的に CAT 活性が上昇した。メディウムに TPA を添加しても同じく CAT 活性が上昇するが、forskolin では無変化であった。この反応は、TSH β プロモーターから Weintraub らが言う nTRE を欠失したコンストラクトを用いても、同じ結果であった。次に、申請者グループが見出した抑制領域 SR を欠失した DNA を用いて TRH 添加による転写活性化を検討した。Pit1 発現ベクター単独ではほとんど影響がないが、GATA2 発現ベクター単独では著明な活性化が認められた。しかし、GATA2 の zinc finger の一つを変異させた変異 GATA2 発現ベクターでは TRH による活性化は認められなかった。また、TRH 刺激により GATA2 蛋白量は変化しないが、標的 DNA の結合が増加することを明らかにした。さらに、Pit1 により活性化する DNA 領域に変異を入れたコンストラクトで検討しても TRH による TSH β プロモーターの活性化は失われなかった。これらのことは、TRH の TSH β 転写活性化は GATA2 を介して行われることを意味している。審査委員会は、TRH による転写活性化は GATA2 によることを明らかにしたことを高く評価した。

以上により、本論文は博士（医学）の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	三浦 直行
	副査	瀬藤 光利
		副査 緒方 勤