

Unliganded thyroid hormone receptor- 1
represses liver X receptor
/oxysterol-dependent transactivation

著者	川合 弘太郎
発行年	2005-03-15
URL	http://hdl.handle.net/10271/247

doi: 10.1210/en.2004-0382

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	医博第 427号	学位授与年月日	平成17年 3月15日
氏名	河合 弘太郎		
論文題目	<p>Unliganded thyroid hormone receptor-β1 represses liver X receptor α/oxysterol-dependent transactivation (リガンド非結合型甲状腺ホルモン受容体-β1 は肝臓X受容体αのオキシステロール依存性転写活性化を抑制する)</p>		

博士(医学) 川合 弘太郎

論文題目

Unliganded thyroid hormone receptor- β 1 represses liver X receptor α /oxysterol-dependent transactivation
(リガンド非結合型甲状腺ホルモン受容体- β 1は肝臓X受容体 α のオキシステロール依存性転写活性化を抑制する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

甲状腺ホルモン受容体(以下TR)と肝臓X受容体(以下LXR)は、リガンド依存性核内受容体であり、共に肝臓に発現して脂質代謝を制御する。これらは甲状腺ホルモン応答領域(以下TRE)やLXR応答領域(以下LXRE)とよばれる10塩基程度のDNA配列に結合し、標的遺伝子の転写をそれぞれ甲状腺ホルモン(T3)およびオキシステロール依存性に活性化する。肝臓での脂肪酸合成はアセチルCoAカルボキシラーゼ(以下ACC)や脂肪酸合成酵素(以下FAS)により促進される事が知られているが、これらの発現はsterol regulatory element binding protein(以下SREBP)-1cによって制御される。近年SREBP-1cのプロモーター領域に2つの機能的LXREが同定された。In vivoの検討ではACCやFASは甲状腺ホルモンにより刺激される事が報告されている。従ってLXRとTRは共通に脂肪酸合成を促進する働きをもつ事が予想されるが、これらシグナル伝達系が互いに及ぼす影響は明らかにされていない。本研究では、TREとLXREはともにdirect repeat 4型という類似した塩基配列を持つ事に着目し、オキシステロール依存性のLXR転写活性化にT3/TR系が及ぼす影響を検討した。

[材料ならびに方法]

トランスフェクション：レポーター遺伝子として、人工的LXREプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を結合させたtk-LXRE(3)-LucあるいはSREBP-1cプロモーターに結合させたpBP1c-2.6-Luc、pBP1-186-Lucを用い、CV-1細胞もしくは293T細胞に各レセプターの発現プラスミドと共にコトランスフェクションした。20時間後、T3またはLXRのリガンドである22(R)-hydroxycholesterol(以下22(R)HC)を加えさらに24時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定し同時に測定した β ガラクトシダーゼ活性で補正した。

ゲルシフトアッセイ：人工的LXREもしくはSREBP-1cプロモーター由来のLXREを³²Pで標識しin vitro translationで作成した各種レセプターと4°Cで30分反応させた後、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にてバンドの検出を行った。

Reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR)：T3、22(R)HC存在下で培養したLXR、TR共に発現している肝細胞癌株、HepG2細胞からRNAを抽出し、SREBP-1cのmRNA量を逆転写酵素(MMTV)でcDNAとしPCRで増幅して半定量した。

Mammalian two hybrid assay：GAL4結合配列を有するレポーター遺伝子(Gal-Luc)を、VP-16に融合したTRならびにGAL-4に融合したコリプレッサー、SMRTとともにCV-1細胞へトランスフェクションし、TR、LXR強制発現の影響をルシフェラーゼ活性を指標に評価した。

GST pull down assay：大腸菌を用いて発現したグルタチオンセファローストランスフェラーゼとコリプレッサー、NCoRの融合蛋白をグルタチオンセファロースビーズに結合させ、³⁵Sで標識したTR、LXRと4°Cで3時間反応させた後5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。

【結果】

tk-LXRE(3)-Luc、pBP1c-2.6-Luc、pBP1c-186-LucなどのLXREはLXRと同様、TRによってもリガンドすなわちT3依存性に活性化された。LXRとTRを同時に発現させたところ、興味深い事にT3非結合TRはLXRの22(R)HC依存性LXRE転写活性化を完全に抑制した一方、22(R)HC非結合LXRはT3/TRによるLXREの転写活性化に影響を与えなかった。T3結合能を欠失し恒常的にコリプレッサーと結合している変異TR、F451Xを用いると、LXRによる活性化を抑制した。コリプレッサー結合能欠失した変異TR(AHTおよびC309K)、RXR結合能のないL428R、DNA結合能のないC127Sではいずれも有意な変化を認めなかった。LXR、TRとも、同等の親和性でレチノイドX受容体(RXR)とヘテロダイマーを形成しLXREに結合することがゲルシフトアッセイで確認された。Mammalian two hybrid assay、GST pull down assayで、TRのコリプレッサーとの結合はLXRと比べて極めて強い事が示された。LXRとTRが発現しているHepG2細胞にT3を添加したところ、22(R)HCを添加した時と同等にSREBP-1cのmRNAは増加し内因性TRにおいてもT3依存性の転写活性が確認できた。

【考察】

当研究において、TRはLXREと結合して、T3依存性に転写を活性化し、T3非存在下ではLXRの作用を強く抑制することが明らかにされた。一方、LXRは22(R)HC非存在下でTRの転写活性に影響を及ぼさなかった。これらの機序としては、TRとLXRは、LXREとほぼ同等の親和性で結合するが、コリプレッサーとの親和性がTRの方がLXRよりはるかに強いためである事が推察された。SREBP-1cの発現量は、ACCやFASの発現調節や肝における脂肪酸合成に大きな影響を及ぼすため、今回の成績はT3、T4が脂質代謝に関与する機序や甲状腺機能異常における脂質代謝異常の機序として重要であると考えられる。今回はSREBP-1cを中心に検討をしたが、LXRの標的遺伝子としてはcholesterol 7 α hydroxylase、ATP-binding cassette transporter 1、cholesterol ester transfer proteinなどが知られている。これらがSREBP-1c同様、T3/TRの影響を受けるかは不明であり、今後の課題である。

【結論】

TRはLXRと同様LXREと結合して、T3存在下ではその転写を活性化し、T3非存在下ではLXRの作用を強く抑制する事により、脂肪酸代謝に影響を与えている事が明らかになった。

論文審査の結果の要旨

甲状腺ホルモン受容体(以下TR)と肝臓X受容体(以下LXR)は、リガンド依存性核内受容体であり、共に肝臓に発現して脂質代謝を制御する。これらは甲状腺ホルモン応答領域(以下TRE)やLXR応答領域(以下LXRE)と呼ばれる10塩基程度のDNA配列に結合し、標的遺伝子の転写をそれぞれ甲状腺ホルモン(T3)およびオキシステロール依存性に活性化する。肝臓での脂肪酸合成はアセチルCoAカルボキシラーゼ(以下ACC)や脂肪酸合成酵素(以下FAS)により促進されることが知られているが、これらの発現はsterol regulatory element binding protein(SREBP)-1cによって制御される。近年、SREBP-1cのプロモーター領域に2つの機能的LXREが同定された。In vivoの検討ではACCやFASは甲状腺ホルモンにより刺激されることが報告されている。従ってLXRとTRは共通に脂肪酸合成を促進する働きをもつことが予想されるが、これらシグナル伝達系が互いに及ぼす影響は明らかにされていない。申請者は、TREとLXREは共に

ダイレクトリピート4型という類似した塩基配列をもつことに着目し、オキシステロール依存性のLXR転写活性化にT3/TR系が及ぼす影響を検討した。

レポーター遺伝子として、人工的LXREを基本プロモーターにつないだLXRE(3)-TK-LucあるいはSREBP-1c遺伝子のプロモーター領域をつないだpBP1c-2.6-Luc、pBP1c-186-Lucを用い、CV-1細胞もしくは293T細胞に各レセプターの発現プラスミドと共に共遺伝子導入をした。まず、人工的レポーターおよびSREBP-1cレポーターをLXR α およびTR β はそれぞれハイドロオキシステロール(以下HC)およびT3濃度依存的に同程度の転写活性化を示すことを見出した。そこで、TR β をLXR α と共に共発現させたところ、興味深いことにT3非結合TR β はLXR α のHC依存的LXRE転写活性化を完全に抑制した。しかし、HC非結合LXR α はT3/TRによるLXREの転写活性化に影響を与えなかった。このT3非結合TR β のLXR α による転写活性化抑制の分子メカニズムを明らかにするためにリガンド結合能のないF451X変異体、コリプレッサー結合能のないAHT、C309K変異体、RXRとヘテロ二量体を形成できないL428R変異体、DNA結合能のないC127S変異体のいずれが抑制能を維持しているか検討した結果、リガンド結合能がなく恒常的にコリプレッサーと結合しているF451X変異体はLXR α による転写活性化を抑制するが、他の変異体はLXR α による転写活性化を抑制できなかった。また、LXR α とTRs1およびその変異体のDNA結合能をゲルシフトアッセイで検討したが、C127S変異体以外は同程度の親和性でDNAに結合することを確認した。

さらに、mammalian two hybrid assayやGST pull down assayでTRs1のコリプレッサーへの結合はLXR α のそれに比し極めて強いことが明らかにされた。最後に、内因性SREBP-1c遺伝子へのT3やHC添加の影響をTRやLXRが発現しているHepG2細胞で検討した結果、T3単独、HC単独でも転写活性化を示すが、両方を添加するとさらに高い転写活性化が起こることが明らかになった。

申請者の研究は、脂質代謝のキー酵素であるACCとFASを制御するSREBP-1c遺伝子の発現制御部位に見出されたLXREにTRも影響を与えることを発見し、その分子機構を明らかにし、TRやLXRが間接的に脂肪代謝に影響を与えていることを明らかにした素晴らしい研究であると高く評価できる。

審査の過程において、申請者に次のような質問がなされた。

- 1) CV-1細胞やHEK293T細胞を選んだ理由は。
- 2) pBP1c-2.6-LucとpBP1c-186-Lucの違いは。
- 3) 用いたTR変異体の特徴は。
- 4) ゲルシフトを用いてLXRとTRのDNAの結合定数を求める方法は。
- 5) 人工的レポーターはダイレクトリピートが順方向であるが、SREBP-1cプロモーターではダイレクトリピートが逆方向になっているが、意味があるのか。
- 6) SREBP-1cプロモーターの2つのLXRE間の距離は。その距離の意味合いは。
- 7) HepG2細胞を用いた実験でHC添加のみの場合、リガンドなしより転写が上昇しているのはなぜか。
- 8) 内因性SREBP-1c遺伝子はT3、HCの両方を添加した時より強い効果をしめしているが、1つのLXREにTRとLXRの両方が結合していると考えなのか。

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、博士(医学)の学位論文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 大関武彦 副査 小田敏明