



N-terminal A/B domain of thyroid hormone receptor β 1 affects transcriptional activity

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 北原, 亮 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1109

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 256号	学位授与年月日	平成10年 3月26日
氏名	北原 亮		
論文題目	N-terminal A/B domain of thyroid hormone receptor $\beta 1$ affects transcriptional activity (甲状腺ホルモン受容体 $\beta 1$ A/B 領域の機能解析)		

博士(医学) 北原 亮

論文題目

N-terminal A/B domain of thyroid hormone receptor $\beta 1$ affects transcriptional activity
(甲状腺ホルモン受容体 $\beta 1$ A/B領域の機能解析)

論文内容の要旨

[はじめに]

甲状腺ホルモン受容体(以下TR)はヒトではTR α とTR β の2つの遺伝子によりコードされ、 $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ の機能的アイソフォームが存在する。TRは構造上N端よりA/B領域、標的遺伝子に結合するC領域、リガンド非存在時に転写抑制因子と結合するD領域、リガンドであるトリヨードサイロニン(以下T3)と結合するE領域に分かれる。TRはレチメイドX受容体(以下RXR)と二量体を形成して標的遺伝子の甲状腺ホルモン応答配列(以下TRE)と結合し、T3と結合して標的遺伝子の転写調節活性を示す。

TR $\beta 1$ と $\beta 2$ はA/B領域を除けばアミノ酸配列が同一であり、両者の機能の差はA/B領域に存在すると考えられている。近年TR $\alpha 1$ のA/B領域内に、主に塩基性アミノ酸から成る転写活性ドメインが存在する事が発表された。TR $\beta 1$ のA/B領域内にも比較的塩基性アミノ酸に富んだ領域が存在しており、こうした領域が転写調節機能をもつ可能性もある。

一方、TR $\beta 1$ のA/B領域には、翻訳開始部位から6及び32番目にもメチオニンコドンが存在し、これらの部位からの翻訳によりN端の長さの異なるTR $\beta 1$ 蛋白が存在する事が報告されている。これらN端の長さの異なるTR $\beta 1$ 蛋白は、機能的に異なる特徴を有する可能性がある。

本研究の目的はこうした背景を踏まえ、TR $\beta 1$ のA/B領域の機能を明らかにする事にある。

[材料ならびに方法]

wild-type TR $\beta 1$ (6番目のメチオニンコドンよりC端のTR $\beta 1$ をコードする遺伝子を発現ベクターpCMXに組み込んだもの)を操作し、TR $\beta 1$ Met6(6番目のメチオニンコドンの3塩基前をアデニンにしたもの)、TR $\beta 1$ Met32(32番目のメチオニンコドンよりN端をコードする部分を欠失したもの)、TR $\beta 1$ -51(N端より50アミノ酸を欠失し、A/B領域内の塩基性アミノ酸に富む部分をコードする部分を除いたもの)及びTR $\beta 1$ -94(A/B領域をコードする部分を全て欠失したもの)を作成した。又、wild-type TR $\alpha 1$ (TR $\alpha 1$ をコードする遺伝子をpCMXに組み込んだもの)とTR $\beta 1$ を操作し、TR $\alpha 1$ -20(N端の19アミノ酸をコードする部分を欠失したもの)、TR $\beta 1(6-50)^+ \alpha 1$ 及びTR $\beta 1(51-93)^+ \alpha 1$ (TR $\beta 1$ の第6~第50、又は第51~第93アミノ酸をコードする部分を各々TR $\alpha 1$ -20の上流に組み込んだもの)を作成した。

CV1細胞に、種々のTREを上流域にもつクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(以下CAT)レポータープラスミドとTR発現プラスミドをトランスフェクションして培養した後に細胞抽出物を回収し、CAT活性を測定して各TRの転写活性を評価した。

TR及びRXRのin vitro翻訳産物を種々のTREと反応させてゲルシフトを行い、TRE上での各TRの二量体形成能を評価した。又、CV1細胞にRXRリガンド結合領域と酵母由来の転写補助因子GAL4のキメラ遺伝子(以下GAL4-RXR)、TR $\beta 1$ リガンド結合領域と単純ヘルペスウイルス由来の転写活性化因子VP16のキメラ遺伝子(以下TR $\beta 1$ -VP16)、GAL4結合領域を含むルシフェラーゼレポータープラスミ

ド、及び TR 発現プラスミドをトランスフェクションして培養した後に細胞抽出物を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定して各 TR と RXR との親和性を評価した。

〔結果〕

TR β 1Met6 と TR β 1Met32 の転写活性能には有意な差を認めなかった。更に、TR β 1-94 は前二者とほぼ同等の転写活性能を有していた。一方、TR β 1-51 の転写活性能は前三者より有意に低下していた。この傾向は検討した全ての TRE で認められた。更に、RXR 遺伝子を同時にトランスフェクションして RXR を過剰発現させたところ、TR β 1-51 の転写活性能は他の TR β 1 とほぼ同程度になった。

又これらの培養細胞の核抽出物を得て T3 結合能を評価したところ、どの TR もほぼ同等の T3 結合能が認められた。更にこの核抽出物に TRE を反応させてゲルシフトを行ったところ、TRE と結合する核抽出物のバンドの信号強度はどの TR でもほぼ同等であった。これよりどの TR もその蛋白の発現量に差がない事が確認された。

in vitro 翻訳産物によるゲルシフトの結果、どの TRE 上でも TR β 1-51 は RXR との二量体形成能が有意に弱い事が確認された。又、TR 発現プラスミドを加えない CAL4-RXR と TR β 1-VP16 による転写活性と比較して TR β 1Met6、TR β 1Met32 及び TR β 1-94 を加えた場合、各々同様に 50~60% 程度転写活性能は低下した。しかし TR β 1-51 では転写活性能の低下は 20~30% 程度に留まった。これより TR β 1-51 は他の TR よりも RXR との結合が弱い事が確認された。

TR β 1(6-50) $^+$ α 1、TR β 1(51-93) $^+$ α 1 の転写活性能は、同時に評価した TR α 1-20 の場合と比較して各々有意に増強或いは減弱した。これは、TR β 1 の第 6~50 アミノ酸及び第 51~93 アミノ酸が各々転写活性化作用及び転写抑制作用をもつ事を示すものと考えられた。

〔考察〕

TR β 1-51 は正常の TR β 1 より転写活性能及び RXR とのヘテロ二量体形成能が有意に低下しており、A/B 領域を全て欠失するとその転写活性能は正常の TR β 1 のレベルに達する事が確認された。この原因として TR β 1-51 が RXR と結合しにくい立体構造を有する可能性も考えられた。しかし、TR β 1 の第 6~50 アミノ酸及び第 51~93 アミノ酸には各々転写活性化作用及び転写抑制作用があり、これらの作用はその位置に関係なく発現される事から、これらの部位が自律的に或いは転写補助因子と結合して、RXR とのダイマー形成にも影響を与え転写制御作用を発現するものと考えられた。

N 端の長さの異なる正常 TR β 1 蛋白には機能上の差異は認められなかったものの、検討に供する細胞やプロモーターの種類によっては違いがみられる可能性もあり、今後検討すべき点と考えられた。

〔結論〕

TR β 1 の第 6~50 及び第 51~93 アミノ酸には各々転写活性化作用及び転写抑制作用があり、RXR とのヘテロダイマー形成能にも影響を与える。

論文審査の結果の要旨

核内受容体スーパーファミリーの一員である甲状腺ホルモン受容体 (TR) は TR α と TR β の 2 つの遺伝子によりコードされ、 α 1、 β 1、 β 2 の 3 種のアイソフォームとして存在する。いずれも N 末端より A/B ドメイン、C ドメイン、D ドメイン、E/F ドメインと呼ばれる 4 つのドメインからなるリガンド依

存性転写調節因子であり、レチノイドX受容体 (RXR) とヘテロ二量体を形成して標的遺伝子の甲状腺ホルモン応答配列 (TRE) 結合し、T3との結合により転写調節活性を示す。各ドメインの機能は詳しく解析されており、CドメインはDNA (TRE) 結合領域、E/FドメインはT3結合且つ二量体形成領域、Dドメインはリガンド非存在時にN-CoR (nuclear receptor co-repressor)、SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) のような転写抑制因子と結合するドメインであることが明らかになっている。しかし、A/Bドメイン、特にTR β 1のA/Bドメインの機能は不明であり、TR β 1のこの領域は転写調節活性と無関係という報告と欠失により転写調節活性が消失するという相反する報告がなされていた。一方、TR α 1のA/Bドメインには転写調節活性に必要で、基本転写因子のTFIIB (transcription factor IIB) と相互作用するbasic amino acid-rich regionが存在することか最近明らかにされた。TR β 1にも同様のbasic amino acid-rich regionが存在するので、今回申請者はTR β 1のA/Bドメインをbasic amino acid-rich region (32~50) とその上流域 (6~31)、下流域 (51~93) に分け、それぞれの機能を検討することを試みた。

Wild type TR β 1およびこれから上流域 (6~31) だけ欠失したTR β 1Met32、上流域とbasic amino acid-rich region (6~50) を欠失したTR β 1-51、A/Bドメインを全部 (6~93) 欠失したTR β 1-94をそれぞれコードする発現プラスミドを作成し、TREを上流域に持つCATレポータプラスミドと共に培養細胞にトランスフェクションして転写促進活性を検討した。その結果、上流域とbasic amino acid-rich region (6~50) の除去 (TR β 1-51) で転写促進活性は有意に低下するが、A/Bドメインを全部除去したTR β 1-94はwild type TR β 1とほぼ同等の転写活性を示した。どのTRの場合にも蛋白としての発現量には差がなく、またこれらTR β 1A/BドメインのフラグメントをN端19アミノ酸欠失TR α 1に繋いだプラスミドでも同じ結果が得られた。更に、上記TRプラスミドをRXR遺伝子と共発現させた実験、*in vitro* 翻訳産物のゲルシフトアッセイ、GAL4-RXR/VP16-TR β 1 (VP16転写活性化因子とTR β 1のD-E/Fドメインの融合蛋白質) 系の転写促進活性に対する拮抗阻害を調べたtwo hybrid assayのいずれにおいても、A/Bドメインの上流域とbasic amino acid-rich region (6~50) の除去によるヘテロ二量体形成能の低下が観察された。申請者は以上より、TR β 1A/Bドメインのbasic amino acid-rich region (6~50) とその下流域 (51~93) はヘテロ二量体形成に影響を与え、それぞれ転写活性化作用、転写抑制作用を持つと結論した。

本研究に関して次のような質疑、試問を行った。

- 1) 1位、6位、32位のAUGコドン (翻訳開始メチオニンコドン) の前後の配列はKozakの共通配列に合っているか
- 2) TREを持つ遺伝子のプロモータの構造
- 3) TRへのT3結合とTR-RXRヘテロ二量体形成/TREへの結合の関係、
- 4) T3非結合時におけるTRの存在様式、作用
- 5) TR-TRホモ二量体の存在、生理的意義
- 6) CV1細胞でのTR発現-転写促進実験をT3が存在しない条件で行うと転写促進は全く認められないか
- 7) 3種のTRE (DR4, Pal, LAP) の生理的意義はどう異なるか、3種類もTREが存在することの必然性あるいは意義についての一般的解釈
- 8) CmaxとBmaxの関係

9) RXRを多量強制発現させた時に見られる転写阻害効果の推定上の機構

これらの質問に対する申請者の答えは適切であり、問題点をよく把握していることを示した。併せて本論文はTR β 1A/Bドメインの機能についての新しい知見を提示した価値ある論文であり、博士(医学)の学位授与に値すると論文審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 市 山 新
副査 教授 大 関 武 彦 副査 講師 西 野 暢 彦