



Ligand-dependent transcriptional interference between VitaminD3 receptors and thyroid hormone receptors by competing common cofactor (s)

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: 夏目, 宏子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1112

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 259号	学位授与年月日	平成10年 3月26日
氏 名	夏 目 宏 子		
論文題目	Ligand-dependent transcriptional interference between VitaminD3 receptors and thyroid hormone receptors by competing common cofactor(s) (ビタミン D₃ レセプター、甲状腺ホルモンレセプター間における補助因子を介するリガンド依存性転写干渉機構)		

博士(医学) 夏目 宏子

論文題目

Ligand-dependent transcriptional interference between VitaminD₃ receptors and thyroid hormone receptors by competing common cofactor(s)

(ビタミン D₃レセプター、甲状腺ホルモンレセプター間における補助因子を介するリガンド依存性転写干渉機構)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

ステロイドホルモン、甲状腺ホルモン、脂溶性ビタミン類は、生物の発生、分化、増殖、恒常性の維持等に深く関与している。これらは、細胞核内のレセプターと結合し、特定の遺伝子上で作用することが知られている。甲状腺ホルモンレセプター (TR)、ビタミン D₃レセプター (VDR) は機能上、構造上の相同性が高く、共にレチノイドXレセプターとヘテロ二量体を形成し、標的遺伝子の特異的塩基配列に結合して基本転写因子、転写介在因子とDNA上で複合体を作り、転写を制御する。このため、両レセプター間には共通する転写機構を通し互いに影響を及ぼしあう可能性がある。TRとVDRの転写機構上の相互作用とその機序に関し検討を行った。

〔方法〕

CV-1細胞にVDR、TRと、レポーター遺伝子を燐酸カルシウム法にてトランスフェクションした。レポーター遺伝子としては VDR に特異的なオステオポンチン (OP)-CAT、オステオカルチン (OC)-LUCまたはTRに特異的なTRE-Pa2-CATを用いた。リガンドとして甲状腺ホルモン (T₃)、1, 25 (OH)₂D₃ (D₃) を添加し24時間培養後にCAT、LUC活性を測定し、転写活性化能を求めた。また内因性のVDRとTRの相互作用については、ROS17/2.8細胞を用いてレポーター遺伝子のみをトランスフェクションし転写活性を測定した。

〔結果〕

1) CV-1細胞にレポーター遺伝子としてOP-CATを用い、TR、VDRを発現させ、10⁻⁹MD₃と10⁻⁷MT₃を添加した際の転写活性を比較した。VDRを発現させD₃を添加すると、転写活性は約8.7倍に増加した。

VDRに加えTRを発現させT₃を添加すると、転写活性は約30%有意に減少した。この転写抑制はT₃依存性で、T₃非添加では認められなかった。

レポーター遺伝子にOC-LUCを用いた場合も、D₃/VDRによる転写活性は、TRを発現させT₃を添加した時のみ約40%抑制された。

2) このT₃依存性のTRによるVDRの転写抑制機序について、以下の検討を行った。阻害機序としてa) TRとVDRがRXRを競合する、b) TRがVDRを奪い取る、c) TRがDNA上でVDREを競合する、d) 転写に関与する何らかの因子を競合する、という可能性を考え実験を行った。

a) TRとVDRがRXRを競合する可能性について：OP-CATをレポーター遺伝子として用い、TR、VDRに加えRXRを各レセプターの5倍量まで過剰発現させた。しかしT₃/TRによる転写阻害の減少は認められなかった。したがってRXRの競合は、否定的と考えられた。

b) TRがVDRを奪い取る可能性について：VDRのリガンド結合領域（VDR/LBD）のみをレセプターの5倍量まで発現させ検討した。もしTRがVDRとヘテロダイマーをつくり、このために機能しうるVDRが減少するのであれば、VDRのリガンド結合領域のみのものを過剰発現させれば、 T_3 /TRによる転写阻害は減少するはずである。しかしVDR/LBDの発現によっても阻害は変化せず、TRがVDRを奪い取る可能性も否定的と考えられた。

c) TRがDNA上でVDREを競合する可能性について：DNA結合領域を欠くリガンド結合領域のみのTR（TR/LBD）を発現させ、正常TRと同様の阻害作用がみられるか否かを検討した。TR/LBDにおいてもTRと同様、リガンド依存性、かつ濃度依存性に D_3 /VDRの転写活性を抑制した。TR/LBDがTRと同様の作用を示したことから、TRの作用はDNAへの結合を必要とせず、TRがDNA結合上でVDRの作用を阻害する可能性は否定的と考えられた。

以上の結果から、 T_3 /TRによるVDR転写活性阻害作用は何らかの転写因子を介する可能性が高いと推測された。

3) 逆に、VDRが T_3 /TRの転写活性を抑制するか否かを、TRE-Pal₂をレポーター遺伝子として用い検討した。VDRは D_3 存在時のみTRの転写活性を阻害した。このことから、TRとVDRが相互に転写因子を競合することが考えられた。そこで、転写因子として、ステロイドレセプターコアクチベーターまたは、cAMP responsive element binding protein (CREB) 結合蛋白 (CBP) を過剰発現させたが、転写抑制を改善できず、これら以外の転写因子の可能性を考えている。

4) これらのTRとVDRの転写機構上の相互作用が、内因性レセプター間でもみられるかを、骨肉腫細胞株のROS17/2.8細胞を用い検討した。レポーター遺伝子としてOC-LUCを用いた。 D_3 添加時にみられる転写活性の上昇は、 T_3 添加により濃度依存性に抑制された。したがって内因性TRも、VDR作用をリガンド依存性に抑制することが確認された。

〔考察及び結論〕

- 1) オステオポンチン、オステオカルチンレポーター遺伝子において、 D_3 /VDRによる転写活性の上昇は T_3 存在時のみTRによって抑制された。同様にTRE-Pal₂において T_3 /TRによる転写活性の上昇も、 D_3 存在時のみVDRで抑制された。
- 2) この機序として、RXRの競合、TR/VDRのヘテロダイマー形成、DNA上の競合等は否定的で、TR、VDRに共通の転写因子に対する競合が考えられた。
- 3) ROS17/2.8細胞の、 D_3 /VDRによる転写活性は、 T_3 添加により有意に抑制された。したがって内因性VDR-TR間にもリガンド依存性の相互作用が存在すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

甲状腺ホルモンレセプター (TR)、ビタミン D_3 レセプター (VDR) は核内レセプタースーパーファミリーに属し機能上と構造上の相同性が高いことが知られている。これらは、共にレチノイドXレセプター (RXR) とヘテロ二量体を形成し、標的遺伝子の特異的塩基配列に結合して基本転写因子、転写介在因子とDNA上で複合体を作り、転写を制御する。このため、両レセプター間には共通する転写機構を通して互いに影響を及ぼしあう可能性がある。TRとVDRの転写機構上の相互作用とその機序に関し以下の検討を行った。

サル腎癌細胞由来のCV-1細胞にVDRとTRならびにビタミン D_3 反応配列 (VDRE) を持つオステ

オポンチン (OP)-CAT またはオステオカルチン (OC)-LUC をレポーター遺伝子として発現させた。リガンドとして甲状腺ホルモン (T_3) と $1.25 (OH)_2D_3 (D_3)$ を添加し転写活性を測定した所、 D_3 添加時のVDRの転写活性の増加TRにより T_3 依存性に30%から40%抑制されることを見出した。この阻害機序について、a) TRとVDRが競合する、b) TRがVDRを奪い取る、c) TRがDNA上でVDREを競合する、d) 転写に関与する何らかの因子を競合する、という可能性を考え実験を行った。a)、b) についてはそれぞれRXRあるいはVDRのリガンド結合領域 (VDR/LBD) のみを過剰発現させてもTRによる転写抑制を解除できないことから否定的と考えられた。c) については、TRの代わりにDNA結合領域を欠くTRのリガンド結合領域 (TR/LBD) を発現させても転写抑制が認められたことから、DNA上での競合の可能性は否定された。また逆に、 T_3 添加時のTRの転写活性は、VDRあるいはVDR/LBDによって D_3 依存性に抑制した。したがって、TRとVDRの作用は相互的であり、VDRの作用もまた、TR同様DNAへの結合を必要としないことが判明した。以上より d) による可能性が高いと考えられた。d) については、ステロイドレセプターコアクチベーター (SRC-1) および cAMP responsive element binding protein (CREB) 結合蛋白 (CBP) を過剰発現させたが転写抑制を解除できず、転写因子の同定はできていない。また内因性のVDRとTRにおいても相互作用が見られるかどうかを、ラット骨肉腫細胞であるROS17/2.8細胞を用いて検討した。 D_3 添加時にみられる転写活性の上昇は、 T_3 添加により濃度依存性に抑制された。したがって内因性TRも、VDR作用をリガンド依存性に抑制することが確認できた。

本研究に関して次のような質疑、試問を行った。

- 1) TRにおいてリガンドの結合はどの段階で生じるか
- 2) TRとステロイドレセプターとの違いはなにか
- 3) 9-cisレチノイン酸の役割はなにか
- 4) HPS-90と結合しているのはステロイドレセプターだけか
- 5) RXRのRXは現在では9-cisレチノイン酸と理解してよいか
- 6) PPARとはなにか
- 7) TR β の β とはなにか
- 8) オステオポンチン、オステオカルチンとはなにか
- 9) ビタミン D_3 で誘導を受ける遺伝子の数はいくつぐらいあるか、またそれらはどのような機能をもった遺伝子か
- 10) 添加した D_3 と T_3 の濃度は、生理的濃度か
- 11) OP-CAT、OC-LUC の2つのレポーター遺伝子を用いた理由は何か、また両レポーター間で転写活性のfold-inductionが大きく異なる理由はなにか
- 12) CV-1細胞の実験において T_3 の抑制作用は濃度依存性があるのか
- 13) VDR/LBDを過剰発現させた実験でVDR/LBDの量を増やすと D_3 /VDRによる絶対的な転写活性はどうか
- 14) SRC-1は活性という点では T_3 /TRによる転写抑制を解除できなかったが、結合でみたときはどうか
- 15) SRC-1にヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性はあるか
- 16) E1Aの結合において、p300とRbは競合するのか
- 17) SRC-1、CBPを発現させた実験において、 D_3 /VDRによる絶対的な転写活性はどうか

- 18) TRを過剰発現させた細胞で、T₃が抑制的に働く可能性はあるのか
- 19) 転写因子とco-activatorとの関連はなにか
- 20) レポーター遺伝子にTATAboxはあるのか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、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 教授 大 野 龍 三

副査 教授 市 山 新 副査 助教授 串 田 一 博