



Thyroid hormone-dependent negative regulation of thyrotropin β gene by thyroid hormone receptors: study with a new experimental system using CV1 cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中野, 桂子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1261

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 408号	学位授与年月日	平成16年 2月20日
氏 名	中 野 桂 子		
論文題目	Thyroid hormone-dependent negative regulation of thyrotropin β gene by thyroid hormone receptors: study with a new experimental system using CV1 cells (甲状腺ホルモン受容体による甲状腺刺激ホルモン β 遺伝子に対する甲状腺ホルモン依存性負調節: CV1 細胞を用いた新しい実験系による研究)		

論文題目

Thyroid hormone-dependent negative regulation of thyrotropin β gene by thyroid hormone receptors: study with a new experimental system using CV1 cells

(甲状腺ホルモン受容体による甲状腺刺激ホルモン β 遺伝子に対する甲状腺ホルモン依存性負調節: CV1 細胞を用いた新しい実験系による研究)

論文の内容の要旨

[はじめに]

甲状腺ホルモン (T3) は、甲状腺ホルモン受容体 (TR) に結合し、種々の遺伝子の転写を調節している。T3/TR による遺伝子の転写活性化のメカニズムは、近年、詳細に解明されてきた。しかし、T3/TR による遺伝子の転写抑制のメカニズムについては、ほとんど不明である。その理由のひとつに、甲状腺刺激ホルモン (TSH) β 遺伝子の負調節を容易に検討できる細胞系が存在しなかったことがある。我々は腎由来 CV1 細胞を用いて、TSH β 遺伝子の負調節を観察しうる新しい実験系を確立した。この系を用いて T3/TR による TSH β 遺伝子の転写抑制機序について検討した。

[材料ならびに方法]

プラスミド: TSH β (-128/+37) -CAT 遺伝子は、ヒト TSH β 遺伝子プロモーター (-128bp から +37bp) の下流にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子を融合させたものを用い、TSH β (-1193/+37) -CAT 遺伝子は TSH β (-128/+37) -CAT 遺伝子の上流にヒト TSH β 遺伝子プロモーターの上流部分 (-1193bp から -129bp) を融合させて作成した。転写因子 Pit1、GATA2 発現プラスミドは各々 pCB⁺、pCDNA3 ベクターに挿入し、TR α 1、B1、B2 はそれぞれヒト TR α 1、B1 発現プラスミド、ラット TRB2 発現プラスミドを pCMX ベクターに挿入したものを使用した。TRB1-C309K およびラット TRB2-F504X、E502X は部位特異的に変異導入した。

細胞培養: CV1 細胞、293 T 細胞、T α T1 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 10% 仔ウシ血清 (FCS)、ペニシリン G (100 単位/ml) およびストレプトマイシン (100 μ g/ml) を加え、5% CO₂/95% 室内気のもと、37°C で単層培養した。

遺伝子導入: 24 時間前に 6cm dish にサブカルチャーしておいた CV1 細胞、293T 細胞に、リン酸カルシウム法で行った。導入する遺伝子の量は pCMX をエンブティベクターとして用い、計 7.2 μ g/dish になるように調整した。B ガラクトシダーゼアッセイにて導入効率を補正し、CMV プロモーターの下流に CAT 遺伝子を融合した CMV-CAT の活性を 100 として相対的な CAT 活性を % で表した。

ウエスタンブロット: CV1 細胞に発現させた種々の TR、および T α T1 細胞の内因性 TR アイソフォームを抗 FLAG 抗体、抗 TR α 1、B1、B2 特異抗体を用いて確認した。

[結果]

TSH 産生細胞への分化決定因子である転写因子 Pit1、GATA2 を CV1 細胞に共発現させると、TSH β -CAT レポーター遺伝子の基礎転写活性が有意に亢進した。ここに TR を共発現させると、T3 濃度依存的、TR 量依存的に転写は抑制された。Pit1、GATA2 非存在下では TR

単独のTSHB 遺伝子転写活性化能は見られなかった。TSHB-CAT の転写抑制は、他の核内受容 No. 2

体とそのリガンドの組み合わせでは認められず、T3/TR 特異的と考えられた。TR の DNA 結合領域を欠失した変異 TR、および DNA 結合領域にアミノ酸変異を導入した TR では転写抑制は消失していた。Coactivator との結合に関与する部位を変異をさせた異常 TR では、T3/TR による負調節は野生型 TR の場合にくらべ、30% 程度減弱していた。甲状腺ホルモン不応症 (RTH) で報告されている変異 TR を野生型 TR と 1:1 で共発現させ、ドミナントネガティブ作用について検討した。その結果、TSHB 遺伝子の負調節における種々の変異 TR のドミナントネガティブ作用の強さは、T3/TR により正調節をうける標的遺伝子の場合とは一致せず、正、負の調節は単純な鏡像関係ではないことが分かった。TR には α 1、B1、B2 の3つのアイソフォームが存在するが、これらのうち下垂体特異的な TRB2 が最も強く転写を抑制した。TSH 産生細胞株である T α T1 細胞において TRB2 のみが特異的に発現していたことと合わせ、TRB2 が中心的な役割を果たしていると考えられた。CV1 細胞で得られた一連の実験結果は、293T 細胞でも確認できた。また、長いプロモーター領域を有するレポーター遺伝子 TSHB(-1193/+37)-CAT においても同様の結果を得た。

〔考察〕

CV1 細胞を用いて TSHB 遺伝子の T3/TR による負調節を検討しうる新しい系を確立した。この系を用いて以下の結果を得た。

1. これまで T3 非結合 TR が TSHB 遺伝子の転写活性化因子と考えられてきた。しかし、今回 Pit1、GATA2 が発現していない条件下では TR 自身が TSHB の転写を活性化することではなく、転写活性化因子は Pit1/GATA2 であり、TR ではないことが明らかになった。
2. TSHB 遺伝子の負調節には、TR の DNA 結合部位が重要である。また coactivator の直接的な関与は少ないと考えられた。
3. TR のアイソフォームのうち、下垂体特異的に発現している TRB2 が最も強く転写を抑制した。TSH 産生細胞である T α T1 細胞で TRB2 のみが発現していたことから、TSHB 遺伝子の転写抑制には TRB2 が中心的な役割を演じていると考えられた。
4. RTH で同定された種々の変異体によるドミナントネガティブ機能の検討において、正、負の調節は単純な鏡像関係ではないことが分かった。

〔結論〕

T3/TR による TSHB 遺伝子の転写抑制機序を解析できる新しい培養細胞実験系を確立した。

論文審査の結果の要旨

甲状腺ホルモン (T3) は、甲状腺ホルモン受容体 (TR) に結合し、種々の遺伝子の転写を調節している。TR は成長ホルモン遺伝子や β アドレナリン受容体遺伝子を正に制御し、甲状腺刺激ホルモン (TSH) β 遺伝子を負に調節している。TR による遺伝子の転写活性化のメカニズムは、近年詳細に解明されてきた。しかし、TR による遺伝子の転写抑制のメカニズムについてはほとんどわかっていない。その理由のひとつには、負の遺伝子調節を検討できる細胞系が存在しなかったことがある。申請者は、腎臓由来 CV1 細胞を用いて、TSH β 遺伝子の転写抑制を観察しうる新しい実験系を確立し、この系を用いて TR による TSH β

遺伝子の転写抑制メカニズムについて検討した。

以前は TSH β 遺伝子が発現している細胞が利用できなかった。そこで、申請者は CV-1 細胞に、ヒト TSH β 遺伝子プロモーター(-128から+37まで) にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子を融合させた TSH β (-128/+37)-CAT と転写因子 Pit1、GATA2 発現プラスミドの 3 者を遺伝子導入することで、TSH β -CAT 遺伝子を発現させ、さらに TR α 1, TR β 1, TR β 2 発現プラスミドも同時に遺伝子導入して、T3 の有無による CAT 活性の変化を測定するという実験系を開発した。まず、この実験系の特性を明らかにした。Pit1 発現プラスミドあるいは GATA2 発現プラスミドと TSH β (-128/+37)-CAT 遺伝子との共遺伝子導入では大きな転写活性化がおこらないが、Pit1、GATA2 発現プラスミド、TSH β (-128/+37)-CAT 遺伝子を共遺伝子導入すると強い転写活性化が起こる。ここに TR β 1 発現プラスミドを T3 非存在下に導入しても転写活性に変化を与えないが、T3 が存在すると強い転写の抑制が起こった。この転写の抑制は T3 量依存적および TR β 1 発現プラスミド量依存的に起こった。ここに、TSH β 遺伝子の T3/TR による負調節を検討しうる新しい実験系を開発した。

申請者は、次にこの負調節に必要な TR 蛋白構造について検討を行った。TR の A/B ドメイン欠失変異体、A/B/C ドメイン欠失変異体発現プラスミドを作製し、これを野生型 TR β 1 発現プラスミドの代わりに遺伝子導入すると、DNA 結合ドメインである C ドメインが残っている変異体は T3 添加による負の制御を行うが、DNA 結合ドメインを欠失させた変異体では T3 による負の調節は起こらなかった。また、DNA 結合ドメインの Zinc finger にあたるシステインを他のアミノ酸に置換した変異体 3 種とも負の調節は起こらなかった。これらのことから、T3/TR による TSH β 遺伝子の転写抑制には TR の DNA 結合ドメインが必須であることが明らかになった。

次に、TR の負の制御に coactivator や corepressor が関与しているかどうか検討するために、corepressor に結合できない TR 変異体や coactivator に結合できない TR 変異体を用いて同じ実験を行った。結果は、いずれも転写活性が低下し、負の調節には corepressor や coactivator は必要ないことが示唆された。

最後に、TR には TR α 1、TR β 1、TR β 2、の 3 種が知られているが、下垂体 thyrotroph 細胞株 T α T1 にいずれのアイソフォームが発現しているかをウエスタンブロットで検討した結果、TR β 2 のみが発現していることを見出した。そこで、今回開発した実験系に TR β 2 発現プラスミドを遺伝子導入し、T3 非存在下では特に影響をおよぼさないが、T3 存在下では著明な転写抑制を示し、thyrotroph における T3/TR による TSH β 遺伝子の負の制御には TR β 2 が中心的役割をしていることを明らかにした。

本審査委員会では、TSH β 遺伝子の T3/TR による負調節を検討しうる新しい実験系を開発し、負の調節には TR の DNA 結合ドメインが重要であり、thyrotroph での負の制御には TR β 2 が中心的役割をしていることを示したことを高く評価した。

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) 培養に用いる血清はホルモン除去をしているか
- 2) 今までに利用されてきた TSH β 発現細胞はあるのか
- 3) 転写活性測定のために CAT を使用した理由は
- 4) 負の制御に RXR は必要か
- 5) プロモーター領域に甲状腺ホルモン反応性エレメントはあるのか
- 6) 甲状腺ホルモンのアイソフォームの違いは

7) 甲状腺ホルモン不応症での変異部位はどこにあるか

8) 負の制御のメカニズムは何か

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、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