



Two Glucose-Signaling Pathways in S14 Gene Transcription in Primary Hepatocytes: A Common Role of Protein Phosphorylation

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 須藤, 裕一郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1476

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 199号	学位授与年月日	平成 7年 3月 3日
氏 名	須 藤 裕一郎		
論文題目	Two Glucose-Signaling Pathways in S14 Gene Transcription in Primary Hepatocytes:A Common Role of Protein Phosphorylation (グルコースによる S14 遺伝子転写調節における蛋白リン酸化の役割)		

博士(医学) 須藤 裕一郎

論文題目

Two Glucose-Signaling Pathways in S14 Gene Transcription in Primary Hepatocytes:
A Common Role of Protein Phosphorylation

(グルコースによるS14遺伝子転写調節における蛋白磷酸化の役割)

論文の内容の要旨

(目的) 食餌中のグルコースは肝における脂肪酸合成酵素の遺伝子転写効率を決定する重要因子である。S14蛋白は、肝、脂肪組織などの脂肪合成細胞に存在し、脂質合成酵素の遺伝子発現を調節していると考えられる。我々は、肝S14遺伝子を食餌中のグルコースまたは甲状腺ホルモンによる脂肪酸合成酵素の転写調節モデルとして用い、S14遺伝子5'-上流域に2つの異なったグルコース反応性エンハンサーを同定し、それぞれ carbohydrate response element (CHORE) 及び thyroid hormone receptor dependent glucose response element (TRDGR) と命名した。CHOREはS14遺伝子の転写開始部分より1069~1583塩基上流に位置し、甲状腺ホルモン及び甲状腺ホルモンレセプターを必要としない。一方TRDGRは転写開始部分より2110~3216塩基上流に位置し、甲状腺ホルモン及び甲状腺ホルモンレセプターを必要とする。現在まで、グルコースシグナル伝達機構から転写を惹起する核蛋白因子は不明であるが、CHOREに於ては、c-myc familyの関与が推定されている。

近年、細胞内のシグナル伝達機構における蛋白磷酸化、蛋白脱磷酸化の重要性が認識されており、細胞内蛋白磷酸化状態の変化が上述の2つの異なったグルコースシグナリング経路に与える影響について protein phosphatase (PP) 阻害剤および protein kinase (PK) 活性化剤を用いて調べた。

(方法) 雄ラット肝より collagenase 灌流法にて肝細胞を分離後、S14遺伝子5'-上流域5Kbをluciferase遺伝子に結合させたレポーター遺伝子(及び必要時甲状腺ホルモンレセプター発現ベクター)をlipofection法にてtransfectionした。transfection終了後さらに48時間、肝細胞を低グルコース(5.5mM)及び高グルコース(27.5mM)を含む培養液中(必要時500nM triiodothyronine 添加)に培養後、細胞を回収し luciferase 活性を測定した。PP阻害剤(okadaic acid、calyculin-A)、PK活性化剤(8-(4-chlorophenylthio) cAMP、12-myristate 13-acetate)、calcium ionophore (A23187) をtransfection 24時間後に投与し、その影響について調べた。またtransfectionに用いたtransfection 24時間後に投与し、その影響について調べた。またtransfectionに用いた培養液中のグルコース消費及びビルビン酸産生を同時に測定した。

(結果) (1) okadaic acidは10nMでグルコース消費及びビルビン酸産生を抑制せず、50nMでグルコース代謝を抑制した。ベータ型甲状腺ホルモンレセプターの有無はokadaic acidのグルコース代謝に及ぼす作用に影響しなかった。

(2) 5nM以上のokadaic acidは甲状腺ホルモン非存在下でS14遺伝子転写を著しく抑制した。この抑制はCHOREをマウス乳癌ウイルスプロモター(mMTV)に結合したベクターにおいても、観察されたことから、蛋白脱磷酸化がCHORE活性化の段階で重要な役割を果たしている事が示唆された。

(3) 甲状腺ホルモン及び甲状腺ホルモン受容体存在下における、グルコース反応性エンハンサーに対するokadaic acidの影響についての検討でも甲状腺ホルモン非存在下同様に、低濃度のokadaic acidにより、S14遺伝子転写は著しく抑制された。

(4) okadaic acidに比しPP1を強力に阻害するcalyculin-Aは、S14遺伝子転写抑制作用が僅か

であった。

(5) PK-A 活性化剤 cAMP は、グルコース代謝を抑制し、S14遺伝子転写を抑制した。

(6) PK-C 活性化剤 12-myristate 13-acetate は S14 遺伝子転写に影響しなかった。

(7) 細胞内カルシウムを増加させる事により、カルシウム / カルモジュリンキナーゼを活性化する A23187 は、グルコース代謝を抑制する事なく、S14 遺伝子転写を抑制し、低濃度 okadaic acid による蛋白リン酸化で得られた結果に類似していた。

(考察) 細胞内蛋白リン酸化状態は PK 活性と PP 活性のバランスにより決定される。真核細胞において、多数の PK が同定されているのに対し、主要な PP 活性は PP 1 と PP 2 A に限られる。したがって我々はまず蛋白リン酸化状態が S14 遺伝子転写に関与しているかどうか PP 阻害剤を用いて調べた。低濃度の okadaic acid により、グルコース代謝を抑制する事なく、S14 遺伝子転写を著しく抑制した事から、細胞内のグルコースシグナル伝達機構において蛋白脱リン酸化が、重要な役割を果たしている事が示唆された。低濃度の okadaic acid により S14 遺伝子転写が抑制された事、及び okadaic acid に比し PP 1 を強力に阻害する calyculin-A による S14 遺伝子転写抑制は僅かであった事より、PP 2 A が関与している可能性が高い。我々は、細胞内蛋白リン酸化促進に関与する 3 つの主要な PK についても調べた。PK-C は S14 遺伝子転写調節に関与せず、PK-A は代謝自身を介した調節である可能性が高い。カルシウム / カルモジュリンキナーゼを活性化する calcium ionophore A23187 は、グルコース代謝を抑制する事なく、S14 遺伝子転写を抑制し、低濃度 okadaic acid による蛋白リン酸化で得られた結果に類似していた。この事実はカルシウム / カルモジュリンキナーゼが、S14 遺伝子転写に重要である可能性がある。これらの S14 遺伝子転写に対する PK 活性化剤と PP 抑制剤の影響は、甲状腺ホルモン及び甲状腺ホルモンレセプターの有無に関わらず、ほぼ一定していた。

(結語) S14 遺伝子転写促進をもたらす細胞内のグルコースシグナル伝達機構において、PP 2 A による蛋白脱リン酸化は促進的に、一方カルシウム / カルモジュリンキナーゼによる蛋白リン酸化は抑制的に関与しており、2 つの異なったグルコース反応性エンハンサー刺激過程 (CHORE および TRDGR) に共通の機構が存在する。

論文審査の結果の要旨

S14 は甲状腺機能正常動物の細胞には検出されるが甲状腺機能減退動物では発現が著しく低下していることで注目された分子量約 17,000、p14.9 の小さな酸性蛋白質である。肝細胞、脂肪細胞、乳腺細胞という脂肪合成の盛んな細胞の核のマトリックスに存在し、その生合成 (特に転写) は T_3 とグルコースにより促進され、グルカゴンにより抑制される。糖尿病でも発現が抑制されることが知られている。これらのことから、S14 の生理的役割として脂肪酸合成系酵素の転写制御への関与が推定されている。

食餌中のグルコース、フルクトース等栄養素がいくつかの酵素の転写効率の重要な制御因子であることはよく知られているが、制御機構や特定の遺伝子の転写制御に至る信号伝達機構等は未だ明かにされていない。申請者は、既にグルコースと T_3 の S14 遺伝子転写促進効果は相乗的であること、および S14 遺伝子の転写開始部位より 1069~1583 塩基上流域、2110~3216 塩基上流域がそれぞれグルコースによる T_3 -甲状腺ホルモン受容体非依存性の転写促進、 T_3 -甲状腺ホルモン受容体依存性の転写促進に必要であることを明らかにし、1993 年に発表している (Endocrinology 133: 129-134, 1991; ibid 1221-1229; いずれも参考文献)。-1069~-1583 領域は Carbohydrate response element (CHORE)、-2110~3216 領域は Thyroid hormone receptor-dependent glucose response element (TRDGR) と名付けら

れた。TRGDR にはグルコースによる T_3 -甲状腺ホルモン受容体依存性 S14 遺伝子転写促進に必須と思われる 3 つの Thyroid hormone response element (TRE) の基本モチーフが含まれていた。

主論文の研究では、申請者は以上の基盤の上に立って、CHORE および TRDGR を介する S14 遺伝子転写制御に対する細胞内蛋白質リン酸化の影響についての検討を行った。初代培養ラット肝細胞に Lipofection 法を用いて移入した次の 3 種類のリポータ遺伝子の発現を指標として実験が行われた。① S14 遺伝子 5' 上流域 5 Kb を Luciferase 遺伝子に結合 (CHORE と TRDGR を両方含む)、② CHORE 欠失 S14 遺伝子 5' 上流域 5 Kb を Luciferase 遺伝子に結合 (TRDGR のみを持つ)、③ マウス乳癌ウイルス (mMTV) プロモータに CHORE と Luciferase 遺伝子を結合 (CHORE のみを持つ)。 T_3 と甲状腺ホルモン受容体存在下と非添加条件下での高濃度グルコース (27.5mM) によるこれらのレポータ遺伝子の発現促進に対する Protein phosphatase 阻害剤 (Okadaic acid, Calyculin-A) と Protein kinase 活性化剤 (8-[4-chlorophenylthio] cAMP, 12-myristate 13-acetate, A23187) の効果の解析の結果、CHORE と TRGDR という 2 つのグルコース反応性エンハンサーを介する S14 遺伝子転写促進のいずれにも、おそらく Protein phosphatase 2 A による蛋白質脱リン酸化は促進的に、たとえば Calcium-calmodulin protein kinase による蛋白質リン酸化は抑制的に関与することが示唆された。

審査委員会は、以上の内容の口頭発表の過程および終了後に次のような質疑、試問を行った。

1. S14 が脂肪酸合成に関与するという実験的証拠
2. S14 遺伝子の IRE (Insulin response element)、および IRE と CHORE の関係
3. S14 遺伝子のプロモータの構造
4. TRDGR に含まれる 3 つの TRE 基本モチーフの方向性
5. 甲状腺ホルモン受容体を十分持っている筈の初代培養肝細胞が T_3 に対する最大反応のために更に甲状腺ホルモン受容体の発現を必要とする理由
6. グルコースの TRGDR を介すると思われる S14 遺伝子転写促進作用において T_3 と甲状腺ホルモン受容体に推定される役割
7. Okadaic acid と Calyculin-A の Protein phosphatase 阻害の特異性
8. グルカゴンによる S14 遺伝子発現抑制の機構
9. CHORE への結合蛋白
10. 本研究で用いたグルコース、 T_3 、インスリン等の濃度は生理的か、本研究は臨床的立場からどのような意義を持つと考えられるか、および本研究の今後の発展の方向性等

これらの質問に対する申請者の応答は概ね適切であり、また研究そのものも努力の跡がみられるよい研究と評価された。以上により、本論文は博士 (医学) の学位授与に値する内容を備えていると論文審査担当者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 中 島 光 好 副査 教授 吉 見 輝 也

副査 講師 大 西 一 功 副査 講師 中 村 浩 淑