



Essential role of TEA domain transcription factors in the negative regulation of the MYH7 gene by thyroid hormone and its receptors

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2019-02-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 岩鬼, 裕之 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003501

博士（医学） 岩鬼 裕之

論文題目

Essential role of TEA domain transcription factors in the negative regulation of the MYH7 gene by thyroid hormone and its receptors

（甲状腺ホルモンとその受容体による MYH7 遺伝子への負の調節において TEA ドメイン転写因子が果たす必須な機能）

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

甲状腺ホルモン（T3）による転写活性化の分子生物学的な機序については、その詳細が明らかにされているが、転写抑制の機序（負の調節）については確立されてない。T3 により転写抑制されるもっとも代表的な遺伝子である thyrotropin β (TSH β) については、これまで T3 受容体 (TR) が TSH β 遺伝子の「負の T3 応答領域 (nTRE)」に結合して T3 非存在下では転写活性化因子として働き、逆に T3 存在下では転写を抑制する機序が推定されてきた。しかし、我々は TSH β 遺伝子の基礎転写を維持する上で必須な転写因子 GATA2 と TR の共存下で検討した結果、転写抑制の本態は TR が GATA2 と相互作用して T3 依存性に GATA2 の転写活性化能を阻害する事 (tethering)、nTRE は必要ない事が示されている。

TSH β 遺伝子と同様、心筋 myosin heavy chain 7 (MYH7) 遺伝子もまた T3 によって負に調節される。そのプロモーターには 2 つの MCAT 配列と A/T-rich 配列が存在し、TEAD/TEF family of transcription factors (TEADs) によって活性化されることが知られる。一方、T3 による負の調節については TSH β 遺伝子の類推から nTRE に類似した配列の存在が推定されて来たが、実験的な根拠は無い。

今回我々は、TEADs による心筋 MYH7 遺伝子の転写活性化の機構を確認するとともに、T3 による負の調節においても TSH β 遺伝子と同様の機序が成り立つか否かを検討した。

〔材料ならびに方法〕

MYH7 プロモーターを持つ chloramphenicol acetyltransferase (CAT) あるいは Renilla ルシフェラーゼ遺伝子を TEADs、TR などの発現プラスミドとともに腎由来 CV1 細胞、ラット心筋細胞 H9C2 細胞へリン酸カルシウム法ないしリポフェクション法で遺伝子導入し、TEADs、TR、T3 存在下での転写活性を調べた。

TEADs を発現した CV1 細胞の核抽出液を用い、³²P で標識した MYH7 遺伝子と TEADs の結合を電気泳動移動度シフト法 (EMSA) にて解析した。

FLAG タグを付加した TR と myc タグを付加した TEADs を共発現した CV1 細胞を用いた共免疫沈降法と TEADs、TR の GST 融合タンパクを用いた GST pull-down assay にて TR と TEADs の相互作用を解析した。

RNA interference (RNAi) にて H9C2 細胞の TEADs 遺伝子の発現を抑制し、MYH7 遺伝子の発現について RT-PCR で解析した。

[結果]

CV1細胞にTEADs、TRを共発現することでMYH7プロモーターをもつCATレポーター遺伝子(MYH7-CAT)はTEADの3種類のアイソフォームのいずれによっても用量に依存性して活性化し、プロモーター領域の欠失・破壊実験やEMSAから、2つのMCAT配列とA/T-rich配列が活性化に必要であって、それぞれの配列にTEADsが結合する事が確認された。内因性にTEAD1を発現するH9C2細胞を用いても同様の結果を認めた。TEADsによる活性化はTR β 1の用量とT3濃度に依存性して抑制された。心筋の主要なTRであるTR α 1にても同様の結果を得た。TR β 1の変異体を用いレポーターアッセイを行ったところ、抑制にはTRのDNA結合領域(DBD)が必要であった。CV-1細胞にTRとTEADsを共発現させ免疫共沈降を行うと、TR β 1とTEADsはT3非依存性に相互作用した。GST pull-down assayを行ったところ、TR β 1のDBDがTEADsのTEA domainと相互作用に関わる事がわかった。RNAiにてH9C2細胞のTEADsの発現を抑制するとMYH7遺伝子の発現は有意に抑制されることが確認された。

[考察]

RNAiにてTEADsの発現を抑制することで、この遺伝子の発現が有意に抑制された事より、MYH7遺伝子の転写を維持する上でTEADsが重要な転写因子であることが確認された。また、レポーターアッセイ、EMSAの結果から、TEADsがMYH7プロモーター上の2つのMCAT配列とA/T-rich配列に結合し、その転写を活性化することが示された。

レポーターアッセイからTEADsによるMYH7遺伝子の転写活性化はT3結合したTR α 1ならびに β 1により抑制され、変異体を用いた実験から抑制には2つのTRに高い相同性を有するDBDが必要である事が示された。免疫共沈降とGST pull-down assayの結果から、TEADにおいてやはり高い相同性を持つTEA domainとTRのDBDとが相互作用することが示された。

[結論]

T3によるMYH7遺伝子の転写抑制機序においては、TRのDBDとTEADsが相互作用し、T3依存性にTEADsの転写活性化を阻害する事で、T3はMYH7遺伝子の転写を抑制することが明らかとなった。従来提唱されていたnTREは必要なく、遺伝子の転写維持に必須な転写因子とTRのタンパク-タンパク相互作用を介してT3が転写を抑制するという点でTSH β 遺伝子との共通の原理(tethering)が見出された。