

GATA2 mediates the negative regulation of the prepro-thyrotropin-releasing hormone gene by liganded T3 receptor β 2 in the rat hypothalamic paraventricular nucleus

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2021-04-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 黒田, 豪 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003814

博士 (医学) 黒田 豪

論文題目

GATA2 mediates the negative regulation of the prepro-thyrotropin-releasing hormone gene by liganded T3 receptor β 2 in the rat hypothalamic paraventricular nucleus

(ラット視床下部室傍核において GATA2 はリガンド結合 T3 受容体による甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子の負の調節を媒介する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

甲状腺ホルモン (T3) による甲状腺刺激ホルモン (thyrotropin、TSH) ならびに甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (thyrotropin-releasing hormone、TRH) への抑制 (負の調節) はホメオステシスの典型であり、どちらも下垂体や視床下部室傍核 (paraventricular nucleus、PVN) に特異的な T3 受容体 (thyroid hormone receptor、TR) である TR β 2 により媒介される事がノックアウトマウスで明らかとなっている。このうち下垂体で発現する TSH は α 、 β 鎖の 2 量体で後者 (TSH β) が TSH の特異性を決める。一方 TRH は前駆体である prepro-TRH タンパク質分解で生成される。従来 TSH β 、prepro-TRH 遺伝子への負の調節は T3 による標的遺伝子の転写活性化 (正の調節) の鏡像であるとされ、これら遺伝子には負の T3 応答配列 (negative T3-responsive element、nTRE) が存在して、その DNA 配列上で T3 非結合の TR β 2 は転写の活性化因子として挙動するとされてきた。実際 1995 年、この前提に立って prepro-TRH 遺伝子の nTRE として site4 という DNA 配列が報告された。今なお成書に記載されているものの、追試はなく nTRE 上で TR β 2 の機能が逆転する機構も不明である。

一方、私達は過去に TSH β 遺伝子について検討し、(1) 転写因子 GATA2 と Pit1 は下垂体における TSH 産生細胞の分化を決定するが、両者を TR β 2 と共発現すれば腎由来 CV1 細胞でも T3 による抑制が観察できた (すなわち TSH β 遺伝子への負の調節においてこの 3 者以外の下垂体特異的な因子は必須ではない)、(2) T3 非結合の TR β 2 は単独では TSH β 遺伝子を活性化し得ない (従って負の調節は正の調節の鏡像ではない)、(3) TSH β 遺伝子の nTRE (1989 年に報告され、site4 のプロトタイプとなった) を破壊しても負の調節は維持される、(4) TSH β 遺伝子の転写を実際に駆動しているのは Pit1 ではなく GATA2 である、(5) TR β 2 は GATA2 とタンパク質-タンパク質結合するという知見を得た。そして私達は「GATA2 の転写活性化能を TR β 2 が T3 依存性に阻害すること (tethering) が TSH β 遺伝子への負の調節の本態である」と提唱してきた。

興味深いことに TRH ニューロンの分化を決定する転写因子 Sim1 と Arnt2 は培養ニューロン細胞で TR β 2 と GATA2 の発現を誘導することが報告されている。今回私達は、prepro-TRH 遺伝子での GATA2 と site4 の意義を検討した。

[材料ならびに方法]

抗 GATA2、抗 TRH 抗体による二重免疫染色でラットの PVN における GATA2 タンパク質を確認した(動物実験計画承認番号 H28-053)。トランスジェニックマウスを用いた解析でラット prepro-TRH 遺伝子の発現には転写開始点の上流 547bp のプロモーター領域で十分であることが知られている。この領域をクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ(chloramphenicol acetyltransferase、CAT) 遺伝子に融合させ、CAT アッセイにより GATA2 や T3 結合した TRβ2 が prepro-TRH プロモーターへ与える効果を検討した。細胞としては CV1 細胞ならびに甲状腺髄様がん由来で TRH を発現する CA77 細胞を用いた。またプロモーターの欠失・変異解析により GATA 応答配列(GATA-responsive element、GATA-RE)の同定と site4 の再評価を行った。GATA2 の GATA-RE への結合は CA77 細胞を用いたクロマチン免疫沈降法(chromatin immunoprecipitation、ChIP)、ならびに GATA2 を強発現した CV1 細胞の核抽出液と ³²P 標識の GATA-RE 用いたゲルシフトアッセイで確認した。

[結果]

(A)ラット PVN の二重免疫染色により TRH ニューロンに内因性の GATA2 タンパク質の発現が確認された。(B)prepro-TRH プロモーターは GATA2 により強く活性化されたが、DNA 結合能が欠損した変異 GATA2(C349A)では活性化し得なかった。(C)欠失・変異解析により -357bp~-352bp に機能的 GATA-RE を同定した。(D)TRβ2 の存在下で T3 は GATA2 依存性の活性化を有意($p < 0.01$)に抑制したが、負の調節は site4 を変異させても維持された。(E)摂食や寒冷刺激を介するメラノコルチン 4 受容体やアドレナリン受容体のシグナルはタンパク質リソ酸化酵素 A(PKA)を介して PVN の TRH 発現を活性化することが知られている。cAMP アゴニストである 8-bromo-cAMP は prepro-TRH プロモーターを約 1.5 倍に刺激したが、T3 結合 TRβ2 による抑制は維持された。すなわち PKA シグナルよりも T3 による抑制が優位と考えられた。(F) CA77 細胞を用いた ChIP アッセイで GATA2 の GATA-RE 結合が示唆された。同様の結果はゲルシフトアッセイでも確認された。(G)CA77 細胞の内因性 TRβ2 を確認の上、この細胞に GATA2 を強発現させると T3 による prepro-TRH プロモーターの抑制を観察し得た。

[考察]

下垂体前葉と同様に GATA2 はラット PVN の TRH ニューロンに発現しており、prepro-TRH 遺伝子の転写を刺激した。この活性は TRβ2 存在下で T3 によって負に調節された。site4 を破壊してもこの抑制は維持され、負の調節における site4 の意義は TSHβ 遺伝子の nTRE(上述)と同様に否定的であった。site4 はルシフェラーゼアッセイを用いて報告されたが、そのアーチファクトが負の調節の解析では無視できない可能性が示唆された。一方、今回の結果は in vivo で既報、すなわちラット PVN での TRH の in situ hybridization の結果や脳の各所での TRH

発現と矛盾せず、それらの背景に存在する分子機序や進化的な側面、臨床知見にも洞察を与えた。

〔結論〕

TSH β ならびにラット prepro-TRH 遺伝子への負の調節に共通の機序として、TR β 2 が GATA2 とタンパク質-タンパク質相互作用し、T3 依存性に GATA2 の転写活性化能を阻害すること、すなわち tethering の機構の存在が示唆された。一方、両遺伝子において「nTRE による負の調節の媒介」という従来のモデルは否定的であった。