



Liganded T3 receptor $\beta 2$ inhibits the positive feedback autoregulation of the gene for GATA2, a transcription factor critical for thyrotropin , a transcription factor critical for thyrotropin production

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2022-01-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 平原, 直子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003937

博士 (医学) 平原 直子

論文題目

Liganded T3 receptor $\beta 2$ inhibits the positive feedback autoregulation of the gene for *GATA2*, a transcription factor critical for thyrotropin production

(T3 結合受容体 $\beta 2$ はサイトロピン産生に必須な転写因子 *GATA2* の遺伝子発現における自動制御/正のフィードバック機構を負に調節する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

甲状腺刺激ホルモン (TSH) は甲状腺にとって最大かつ最強の成長・刺激因子である。TSH 産生は甲状腺ホルモン (T3 とその前駆体 T4) によってネガティブフィードバックを受ける。この負の調節が下垂体特異的な T3 受容体 (TR) $\beta 2$ を介することはその欠失マウスの所見から明らかである。ところで生体内では T3、T4 と TSH との関係は単なる反比例ではなく、前者が整数的に増加する際、後者は指数関数的に減衰する (log-linear の関係)。この非線形で鋭敏な制御こそ下垂体-甲状腺系の恒常性の核心であるが、その本質は明らかでなかった。TSH は α 鎖 (絨毛性ゴナドトロピン α 鎖、CGA) と β 鎖 (TSH β) の 2 量体であり、ホルモン特異性は後者が決める。両遺伝子の発現には転写因子 *GATA2* が必須であり、*GATA* 応答領域 (*GATA-RE*) が存在する。そして下垂体特異的な転写因子 *Pit1* が共存すると前駆細胞に TSH β が発現し TSH 産生細胞へと分化する。T3 による負の調節の機序として、申請者らは TR $\beta 2$ タンパク質が T3 依存性に *GATA2* タンパク質の転写活性化能を阻害する (tethering) というモデルを提唱している。興味深いことに *GATA2* 遺伝子にも複数の *GATA-RE* が存在し、*GATA2* タンパク質自身による活性化を受ける (autoregulation)。今回申請者らは TR $\beta 2$ が TSH β 、CGA のみならず、T3 依存性に *GATA2* 遺伝子のポジティブフィードバックをも負に調節することが下垂体-甲状腺系の非線形な log-linear の関係の背景になっている可能性を検討した。

[材料ならびに方法]

(1) *GATA2* プロモーターにその *GATA-RE* を結合した DNA 断片 ((-3.9) 1S-*GATA-RE*、(+9.5) 1S-*GATA-RE*) をクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) のレポーター遺伝子に結合した。腎由来の CV-1 細胞は内因性に *GATA2*、TR $\beta 2$ 、*Pit1* を発現せず、今まで T3 による転写調節の解析に頻用されている。これらレポーター遺伝子を *GATA2*、TR $\beta 2$ の発現プラスミドと共に CV1 細胞に遺伝子導入し CAT 活性を測定した。(2) TR $\beta 2$ 自体が T3 依存性に非線形な様式で転写を抑制する可能性もあり得る。そこで T3 結合 TR $\beta 2$ による負の調節が古典的な抑制因子の数理モデル (U.Alon によって提唱された多次元入力関数) に従うか 否かを Mathematica ソフトウェアで検証した。(3) 下垂体由来 L β T2 細胞は内因性に *GATA2* と CGA、TR $\beta 2$ を発現し、細胞内の *GATA2* 発現には autoregulation が存在すると考えられる。一方、*GATA2* タンパク質はユビキチン化によって半減期 30 分で分解される。そこでプロテアソーム

阻害剤 MG132 の存在下で T3 による GATA2 タンパク質レベルの変動を調べた。さらに (4) 様々な T3 濃度での GATA2 の mRNA 発現を RT-qPCR で評価した。

[結果]

(1) (-3.9) 1S-GATA-RE-CAT、(+9.5) 1S-GATA-RE-CAT は GATA2 の共発現によって活性化され、TRβ2 の共存下では T3 による転写抑制が観察された。実験の便宜上から最初は T3 濃度を対数軸、CAT 活性を整数軸でプロットしたが、両者を整数軸とすると、負の調節はさらに急峻なものになった。(2) (+9.5) 1S-GATA-RE-CAT を用い、CAT 活性、GATA2 発現量、T3 濃度の 3 次元グラフを作成し解析したところ、多次元入力関数の定数が同定された。このことは (a) T3 結合した TRβ2 が古典的な転写の抑制因子であるが、非線形な制御は説明し難いこと、そして (b) 生体内で見られる log-linear の関係の要因としては、T3 によって前述の GATA2 遺伝子における autoregulation が負に調節されることが重要であると推定された。(3) 内因性に GATA2 遺伝子を発現する LβT2 細胞には GATA2 遺伝子とその翻訳産物 (GATA2 タンパク質) による autoregulation が存在するはずである。実際、T3 添加にて GATA2 タンパク質は劇的に減少した。この減衰は MG132 では影響されず、GATA2 遺伝子の翻訳前すなわち転写レベルでの抑制と考えられた。(4) RT-qPCR で調べると LβT2 細胞の GATA2mRNA (縦軸) は対数目盛りの T3 濃度 (横軸) により減衰し、両軸を整数軸にするとより急峻な抑制となった。さらには生体内での評価を模して前者を対数軸とし後者を整数軸とすると中等度の甲状腺機能低下症～正常の T3 濃度において GATA2mRNA との log-linear 様の関係を認めた。

[考察]

TSHβ 発現の主要な活性化因子は転写因子 GATA2 であり、前述のように TRβ2 タンパク質が tethering の機序で T3 依存性に GATA2 タンパク質の転写活性化能を阻害することで TSHβ や CGA 遺伝子が T3 で負に調節されることを報告してきた。GATA2 遺伝子の発現はその翻訳産物 GATA2 によって autoregulation されるが、今回の検討でこの非線形なポジティブフィードバックもまた T3 結合した TRβ2 によって抑制されることが判明し、T3 と TSH の log-linear の関係の背景になっている可能性が示唆された。一方、CAT アッセイの結果を U. Alon らの数理モデルで検討すると、T3 結合 TRβ2 タンパク質は古典的な転写の抑制因子にすぎず、非線形な log-linear の関係は説明するものではなかった。また GATA2 を内因性に発現する LβT2 細胞では中等度の甲状腺機能低下症～正常の T3 濃度で log-linear 様の関係が観察された。この抑制は GATA2 タンパク質のユビキチン化とは独立したものと考えられた。当研究グループでは既に甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) をコードする preproTRH 遺伝子の発現にも GATA2 と TRβ2 による tethering 機序を報告しており、視床下部の TRH 発現でも同様の機序が存在する可能性、さらには視床下部-下垂体間のカスケードによる増幅の可能性が示唆される。甲状腺ホルモン不応症 (TRβ 異常症) や TSH 産生腫瘍は希少疾患であり、診断がつかないままになっている事も少なくない。発見の糸口

となるのは T3 に対する TSH の鋭敏な反応性の障害（TSH の不適切分泌）であるが、現象論に留まり臨床家の経験的な判断に依存している。当研究グループが知る限り log-linear の現象を説明する理論的な根拠を示し得たのは今回が初めてである。

〔結論〕

GATA2 遺伝子におけるポジティブフィードバック/autoregulation は TR β 2 を介して T3 による非線形な負の転写調節を受ける。これが T3、T4 と TSH のネガティブフィードバックにおける log-linear の関係の背景になっている可能性が示唆された。