



Inhibition of GATA2-dependent transactivation of the TSH β gene by ligand-bound estrogen receptor α

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-01-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 長山, 浩士 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/819

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 4 6 1 号	学位授与年月日	平成 2 1 年 1 月 1 6 日
氏 名	長 山 浩 士		
論文題目	Inhibition of GATA2-dependent transactivation of the <i>TSHβ</i> gene by ligand-bound estrogen receptor α (リガンド結合エストロゲンレセプター α による GATA2 依存性 <i>TSHβ</i> 遺伝子転写活性の抑制)		

博士(医学) 長 山 浩 士

論文題目

Inhibition of GATA2-dependent transactivation of the *TSH β* gene by ligand-bound estrogen receptor α
(リガンド結合エストロゲンレセプター α による GATA2 依存性 *TSH β* 遺伝子転写活性の抑制)

論文内容の要旨

[背景]

甲状腺ホルモン受容体(TR)やエストロゲン受容体(ER)など核受容体は、リガンドが結合すると標的遺伝子の転写を活性化する(正の調節)。核受容体の DNA 結合領域(DBD)は、標的遺伝子のプロモーター上のホルモン応答配列(HRE)に結合する。この時 HRE を構成する 2 つのハーフサイトとその間の塩基数が核受容体の特異性を規定する。しかし、TR とレチノイン酸受容体、TR とコレステロール代謝に関わる Liver X 受容体がほぼ同一の HRE に結合するなど曖昧さが認められ、核受容体間のクロストークの存在が想定される。

下垂体で産生される甲状腺刺激ホルモンは α 鎖(TSH α)と β 鎖(TSH β)からなり、いずれの mRNA も T3 の結合した TR(T3/TR)により特異的に抑制される。一方、エストロゲン(E2)も薬理量を用いればラットの TSH α 、 β mRNA 発現を抑制し、逆に E2 受容体(ER) α 欠失マウスでは両 mRNA が増加し、TR 欠失マウスに似た表現型が示される。私達はこれまで *TSH β* 遺伝子について、(1)腎由来 CV1 細胞においても TSH 産生細胞の分化決定因子である Pit1 と GATA2 を発現させれば、T3/TR による *TSH β* プロモーターへの負の調節を観察できること、(2)TR のサブタイプの内、下垂体特異的な TR β 2 が最も強い抑制を示すこと、(3)TR の DBD は *TSH β* プロモーターに直接結合するのではなく、GATA2 の Zn フィンガー領域と蛋白-蛋白結合することを報告している。今回、この CV1 細胞系を用いて E2/ER α の *TSH β* 遺伝子に対する作用を検討した。

[方法]

トランスフェクション実験では-128bp から 37bp の human *TSH β* プロモーターを用いた。24 時間前に継代培養しておいた CV1 細胞 10^6 個に hTSH β 、Pit1、GATA2、ER 発現プラスミドと β ガラクトシダーゼ(β gal)発現プラスミドをリン酸カルシウム法にて遺伝子導入した。20 時間後培養液を交換し、さらに 24 時間後に回収し CAT アッセイを行った。導入効率は β gal 活性で補正した。

[結果]

種々のリガンド/受容体の転写調節能をレポーターアッセイで検討したところ、ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 γ 2 やビタミン D3、レチノイン酸、レチノイド X 各受容体はリガンド存在下で *TSH β* プロモーター活性に影響しなかった。しかし、E2/ER α は有意に *TSH β* プロモーター活性を抑制し、その強度は T3/TR の約 2/3 であった。TSH β の発現には Pit1 と GATA2 の共存が必要であることが報告されている。しかし私達の検討では GATA 応答配列の下流約 30bp を欠失すると GATA2 単独でも転写が活性化される。このような GATA2 単独で活性化された *TSH β* 遺伝子活性も E2/ER α で明らかに抑制された。一方、Pit1 は過剰発現すると E2/ER α による *TSH β* プロモーターの抑制を減弱した。E2/ER α による抑制は GATA2 の Zn フィンガー領域と相同性の高い GATA1 に対しても認められた。N端側 Zn フィンガーの変異体 C295A は TSH β 転写活性を示したが、T3/TR や E2/ER α による抑制には抵抗性であった。GST pull-down assay と ER α の欠失実験で、ER α の DBD が GATA2 の Zn フィンガーと相互作用することが示された。ER α の DBD 変異体(C205S, C221G, C240S)を作製し、正の調節(E2 による転写活性化)における

DBD の機能と負の調節 (E2 による転写抑制) におけるそれとを比較したところ、いずれの DBD 変異体も E2 応答配列 (ERE) との結合が障害されており、正の調節も消失していた。一方、C205S と C221G は *TSHβ* 遺伝子への抑制作用を失っていたが、C240S は維持していた。GST pull-down assay ではいずれの変異 ERα も GATA2 と結合することが観察された。また、ERα の A/B 領域の欠失変異体 (Δ170) は E2 依存性の転写活性化能を保持していたが、*TSHβ* 遺伝子への抑制は減弱していた。ERα のサブタイプとして ERα の他に ERβ があり、その A/B 領域は相同性が低いことが知られている。GATA2 により活性化された *TSHβ* 遺伝子の E2 による抑制は ERβ では減弱していた。

培養 TSH 産生細胞株 TαT1 において T3、E2 による *TSHβ* mRNA 量の変化を RT-PCR で検討したところ、いずれも有意な減少を示し、E2 は T3 の 2/3 の強さであった。

今回得た知見の臨床的意義を検討するため、単純性甲状腺腫で受診した甲状腺自己抗体陰性の女性患者 134 人の血清 TSH 値を測定し、閉経前後で比較した。閉経前に比べ閉経後の女性は、血中 E2 は著明に低下し、TSH は有意に上昇していた。遊離 T4 は変化しなかった。

[考察]

E2/ERα による *TSHβ* 遺伝子抑制の分子機序について検討した。E2/ERα の標的は GATA2 であり、Pit1 の過剰発現は抑制を減弱した。さらに GATA2 の Zn フィンガー領域が ERα と相互作用することが分かった。一方、ERα については ERE の認識に必要な DBD の高次構造は *TSHβ* 遺伝子の抑制には必ずしも必須ではないこと、GATA2 との物理的な結合だけでは転写抑制には不十分であることが明らかとなった。さらに負の調節における ERα の A/B 領域の重要性が示唆された。

臨床的に TSH の抑制は T3 に特異的と見なされてきた。しかしこれまでの検討では、E2 の作用が T3 の作用にマスクされ見逃されてきた可能性がある。事実、閉経後の女性では血中 TSH が少し上昇した。閉経により E2 が著明に低下し、E2 の *TSHβ* 遺伝子抑制作用が失われることが原因の一つであると考えられる。

[結論]

今回の研究で、E2/ERα が T3/TR と同様に *TSHβ* 遺伝子を負に調節していることを見出した。E2/ERα による抑制は T3/TR の 2/3 程度ではあるが分子機序は共通であり、両者間に *TSHβ* への負調節における曖昧さが存在すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

甲状腺ホルモン受容体 (TR) やエストロゲン受容体 (ER) などの核内受容体は、リガンドが結合すると標的遺伝子のホルモン反応性エレメント (HRE) に結合し標的遺伝子を活性化する。典型的な ER の HRE は AGGTCA (N₃) TGACCT、TR の HRE は AGGTCA (N₄) AGGTCA であり、ER のホモ 2 量体が同軸上の AGGTCA パリンドロームに、レチノイン酸 X 受容体 (RXR) とヘテロ 2 量体を形成した TR が 3' 側の AGGTCA に結合する。リガンドが結合していない ER ホモ 2 量体や TR ホモ 2 量体も HRE には結合できるが、この場合抑制性のコレプレッサーが結合し標的遺伝子の転写を抑制している。

一方、核内受容体による転写抑制のメカニズムについてはあまり知られていないので、申請者の研究室では TR による甲状腺刺激ホルモン (*TSHα, β*) 遺伝子の転写抑制機構について研究し、以前に (1) 腎臓由来 CV1 細胞において Pit1 と GATA2 を発現させれば、*TSHβ* プロモーターが転写活性化され、T₃/TR

による *TSHβ* プロモーターへの転写抑制が観察できること、(2) 下垂体特異的に発現している *TRβ2* が最も強い抑制を示すこと、(3) *TR* の DNA 結合ドメイン (DBD) は *TSHβ* 遺伝子に直接結合するのではなく、*GATA2* の Zn フィンガーと蛋白—蛋白結合をすることで転写抑制をすること、を報告してきている。

申請者は、*TR* と *ER* の結合塩基配列の類似性、薬理量のエストロゲン (E_2) を投与するとラットの *TSHα, β* mRNA が減少すること、*ERα* ノックアウトマウスでは両 mRNA が増加すること、から CV1 細胞系を用いて $E_2/ERα$ による *TSHβ* 遺伝子抑制のメカニズムを検討した。

ヒト *TSHβ* プロモーター (−128/+37) を CAT レポーターに連結した DNA および *Pit1*, *GATA2*, *TRβ2*, *ERα*, *PPARγ*, *VD₃R*, *RAR*, *RXR* 発現ベクターを CV1 細胞にリン酸カルシウム沈殿法で遺伝子導入し、その後ホルモン添加の有無でのプロモーター活性を測定した。*TRβ2* 以外で *TSHβ* プロモーターが抑制されたのは $E_2/ERα$ のみであった。CV1 細胞において、*Pit1* と *GATA2* が *TSHβ* プロモーターを活性化するが、*ERα* による抑制は E_2 存在下でのみ見られ、 E_2 濃度依存性および *ERα* 量依存性を示した。そして、 $E_2/ERα$ による抑制は *Pit1* 発現量を増やすと減少した。 $E_2/ERα$ による *TSHβ* プロモーターの分子メカニズムを解明するため、種々の変異 *GATA2* や変異 *ERα* を用いて解析を行った結果、*ERα* は E_2 の結合にかかわらず *GATA2* の Zn フィンガー部位に *ERα* の DBD を介して蛋白—蛋白結合すること、*ERα* による抑制には 240 番目のシステインや N 末ドメインが必須であることが明らかになった。

最後に、内因性に *TSHβ* を発現している thyrotroph 細胞である TαT1 で E_2 の作用を検討した。 E_2 により *TSHβ* mRNA が約 50% に減少した。また、血中 E_2 濃度の低下する閉経後の女性では、TSH 量が有意に増加していた。

審査委員会は、 $E_2/ERα$ が *GATA2* を介して *TSHβ* 遺伝子の発現を抑制している事実を発見したことおよびその分子メカニズムを明らかにしたことを高く評価した。

審査会では、以下のことについて質問がなされた。

- 1) なぜ CV1 細胞を選んだか
- 2) なぜレポーターに CAT 遺伝子を用いているか
- 3) リガンド非存在下に *TR* や *ER* を遺伝子導入した時、プロモーター活性が上昇するのはなぜか
- 4) *GATA2-C259A* の変異蛋白の性質は何か
- 5) CV1 細胞へのリン酸カルシウム沈殿法による遺伝子導入の効率はどうのくらいか
- 6) リガンドの有無による遺伝子発現制御のメカニズムは何か
- 7) Zn フィンガーの意義は何か
- 8) 核内受容体が標的 DNA 配列をどのように区別しているか
- 9) E_2 が TSH 発現抑制をする生理的意義は何か

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、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 永田 年 小田 敏明