

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790884

研究課題名（和文） 甲状腺ホルモンのノンゲノミック作用による p27^{Kip1} の調節機序とその意義研究課題名（英文） Regulatory mechanisms of p27^{Kip1} and its significance by non-genomic action of thyroid hormone.

研究代表者

曹 霞 (CAO Xia)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：70432218

研究成果の概要（和文）：本研究は、T3 が p27^{Kip1} の Thr¹⁸⁷ リン酸化を抑制し、p27^{Kip1} の Ubiquitin 化を減弱することによって p27^{Kip1} の蛋白レベルを増加することを明らかにした。この T3 ノンゲノミック作用は細胞周期を制御することによって、細胞の分化を促進する一方、増殖を抑えた。

研究成果の概要（英文）：T3 inhibited the ubiquitination of p27^{Kip1} through inducing the Thr187 phosphorylation of p27^{Kip1}, and thus enhanced p27^{Kip1} expression. This further promoted the cell differentiation and inhibited cell proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
H22年度	¥2,100,000	¥630,000	¥2,730,000
H23年度	¥1,000,000	¥300,000	¥1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	¥3,100,000	¥930,000	¥4,030,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：基礎医学・内分泌

キーワード：甲状腺ホルモン・ノンゲノミック作用・p27^{Kip1}

1. 研究開始当初の背景

今までの成果として、T3 のノンゲノミック作用は PI3K-Akt 経路を活性化することによって神経細胞に抗アポトーシス作用を発揮すること、また T3 によって TR/Src/p85a の複合体の形成すること、さらに、MNAR の参与する可能性が示唆された。

さらに、神経細胞の保護作用を介して脳発

育を促進させることが示唆された。

一方、甲状腺ホルモン (TH) はヒトの発育・成長並びに代謝調節に重要である。これまでの多くの T3 作用の研究は、核内受容体 (TR) を介する遺伝子発現調節を中心に進められてきたが、こうしたゲノミック作用だけでは多彩な T3 作用を十分に説明することができ

なかった。近年、遺伝子発現調節以外の TH 作用（ノンゲノミック作用）も注目されている。我々は、PI3K-Akt-mTOR シグナル経路を調節する新しい T3 のノンゲノミック作用を(1) 報告した (Molecular Endocrinology, 19: 102, 2005; Biochemical Journal 424(2): 201-209, 2009)。この作用は従来の TH のノンゲノミック作用と異なり、TR が関与していることを明らかにした。

最近我々は、DNA 結合能を欠く TR-beta 変異体を発現する細胞で、T3 が p27^{Kip1} の発現を増加し、細胞周期を調節することを見出した。さらに、我々の先行実験で、以下のような結果を得られた。

(1) T3 は細胞内 p27^{Kip1} 蛋白量を増加したが、p21^{Cip1} への影響は認められなかった。

(2) T3 による p27^{Kip1} 蛋白の増加は 6 時間以内では認められたが、p27^{Kip1} mRNA の量は変わらなかった。

(3) RNA 合成阻害剤 actinomycinD の存在下であっても、T3 は p27^{Kip1} 蛋白量を増加させていた。

以上の結果から、T3 が TR-beta を介し、細胞内 p27^{Kip1} の蛋白量を短時間で調節する、新しいノンゲノミック作用であることが示された。

一般的に、p27^{Kip1} の蛋白量は mRNA の転写、蛋白の合成と分解の 3 つの段階で調節されている。ActinomycinD の存在下でも T3 の作用が認められたことから、T3 は p27^{Kip1} の蛋白合成あるいは分解を調節することが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、T3 がどのように p27^{Kip1} を調節するのか、新たな T3 のノンゲノミック作用の分子基盤を明らかにするとともに、その生理的意義を主に神経細胞を対象として明らか

かにする。

3. 研究の方法

(1) p27^{Kip1} を調節する T3 の non-genomic 作用の分子基盤を明らかにするために、神経芽細胞腫株 (Neuro2a; N2a 細胞) を用いて、T3 が p27^{Kip1} の蛋白合成効率、リン酸化状態、ubiquitin 化状態、蛋白安定性に及ぼす影響を検討した。また、この際の TR・の役割を明らかにするために、様々な TR・変異体を細胞に一時的、或いは恒常的に導入し検討した。
(2) 癌細胞における T3 による p27^{Kip1} の調節とその意義を明らかにするために、肝癌患者で認められた TR・変異体をヒト肝細胞癌株に導入し、細胞の増殖性と浸潤性並びに T3 や p27^{Kip1} siRNA の影響を検討した。

4. 研究成果

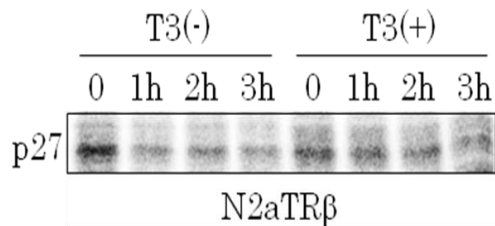
T3 による p27^{Kip1} の調節分子機序を解明するために以下の実験を行った。

(1) まず pGL-IRES を用いて、Reporter gene assay を行った。p27^{Kip1} mRNA の IRES を pGL3-basic plasmid の luciferase 遺伝子の 5' 上流に組み込んだ plasmid (pGL-IRES) を作製し、N2aTR-alpha と N2aTR-beta 細胞に導入した。T3 刺激により、luciferase 活性が上昇すれば、T3 は IRES を介して p27^{Kip1} の蛋白合成効率を増加することが明らかになる。その結果、T3 の添加は以上の細胞で luciferase 活性を増加しなかったため、p27^{Kip1} の蛋白合成効率に影響がないことを示唆した (data not shown)。

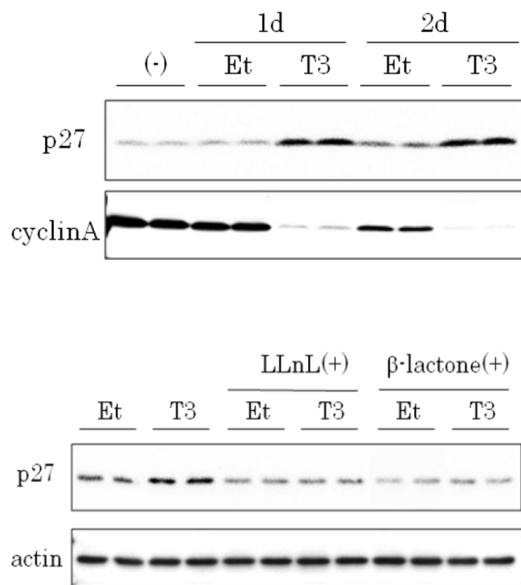
(2) 次に N2aTR-beta と N2aTR-beta 細胞を用いて、pulse-chase 法で一定時間内に合成された p27^{Kip1} 蛋白を標識し、その後標識された蛋白が T3 存在下、非存在下での経時的変化を追跡し、蛋白の安定性を検討した。

その結果、N2aTR-beta 細胞で、T3 は p27^{Kip1}

蛋白安定性を促進したが、N2aTR-beta 細胞では変化が認められなかった。また、N2aTRGS 細胞でも N2aTR-beta と同じ結果を得られた。これは、T3 が特異的に TR-beta 受容体を介し、p27^{Kip1} 蛋白安定性を促進する作用があることを示唆している。さらに、TRGS は DNA 結合能が欠損しているため、以上の作用は TR-beta 受容体ノンゲノミック作用であったことも示唆された。



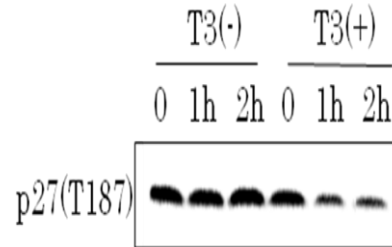
(3) N2aTRGS 細胞を proteasome 阻害剤 LLnL や beta-lactone で前処理し、抗 p27^{Kip1} 抗体を用いた Western Blotting 実験を行い検討した。



Et; エタノール処理したコントロール細胞 ;
T3; エタノールで 10⁻⁷M

(4) N2aTRGS 細胞の p27^{Kip1} の Thr¹⁸⁷ リン酸化

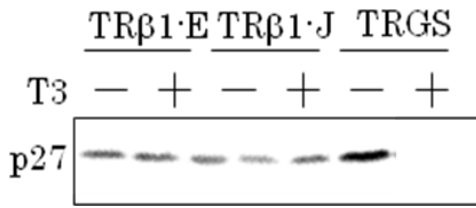
を、Thr¹⁸⁷ のリン酸化部位を特異的に認識できる抗体を用いることによって、Western Blotting 実験により検討した。その結果、T3 が p27^{Kip1} の Thr¹⁸⁷ リン酸化を抑制した。



(5) ヒト肝細胞癌では、その70%以上がTRの変異を持つと言われている。これらの変異は主にTRのT3結合領域にあり、DNA結合領域だけの変異体についてはまだ報告がされていない。T3の細胞分化作用がTRの変異で阻害されることが発癌の一つの原因だと考えられている。

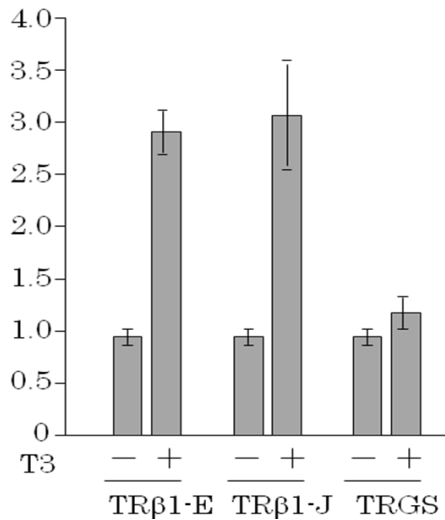
そこで、本研究ではヒト肝細胞癌由来の HepG2細胞を用いて、その増殖性と浸潤性に対する、p27^{Kip1}を介したT3の作用を検討することとした。HepG2細胞に、pcDNA3.1/TRGS (DNA 結合能欠損)、pcDNA3.1/TR-beta1-E と pcDNA3.1/TRbeta1-J (両者はhepatocellular carcinoma患者に同定された変異体で、TR-beta1-E はT3結合領域とDNA結合領域に変異を有し、TR-beta1-JはT3結合領域だけに変異を有する) を導入し、これらのTRを恒常的に発現する細胞を樹立した。

これらの細胞に、T3によるp27^{Kip1}の発現調節をWestern Blotting法で検討を行った。TRGS発現している細胞に限っては、p27^{Kip1}はT3により発現量が促進されていることが示された。



以上の結果から、T3はTR-betaと結合して、nongenomic作用を介して、p27^{Kip1}の発現量を調節することを強く示唆された。

(6) また、CK8 kitを用いて、癌細胞増殖に対するTR変異体の影響も検討した。その結果、TRGSではなく、TR-beta1-EとTR-beta1-Jを発現している細胞の増殖が促進されることが確認された。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曹霞 (CAO Xia)

研究者番号：70432218

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：